



**Humberto Agostinho Pedroso**

Licenciado em Bioquímica

**Características estruturais e  
mecanísticas da enzima desnitrificante  
Redutase do Nitrito Citocromo *cd*<sub>1</sub>**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Biotecnologia**

**Presidente de júri:** Professor Doutor Pedro Miguel Calado Simões,  
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL)

**Arguente:** Doutora Smilja Todorovic,  
Investigadora Auxiliar do Instituto de Tecnologia Química e Biológica  
da Universidade Nova de Lisboa (ITQB-UNL)

**Vogal:** Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,  
Professora Associada do Instituto Superior de Ciências da  
Saúde Egas Moniz



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

## **Características estruturais e mecanísticas da enzima desnitrificante Redutase do Nitrito Citocromo *cd<sub>1</sub>***

Copyright © Humberto Agostinho Pedroso, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

**A Jesuína Guilhermina de Carvalho**

(Avó “Laura”)



## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de expressar, nestas singelas palavras, o meu agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma possibilitaram que pudesse desenvolver a tese que se apresenta.

Em primeiro lugar, um agradecimento muito especial à Dra. Maria Gabriela Almeida por ter possibilitado a realização desta tese, sob a sua orientação e pelos conhecimentos transmitidos a todos os níveis.

Ao Professor Dr. José Moura e à Professora Dra. Isabel Moura por me integrar nos seus grupos de investigação.

Um agradecimento muito especial à Dra. Célia Silveira pela sua “co-orientação”, embora não formalizada, pela total disponibilidade para dúvidas e auxílio constante. Obrigado.

Ao Dr. Rui Almeida por todos os conhecimentos transmitidos no campo do *docking* de proteínas, pela sua total disponibilidade e enorme paciência nas explicações e acompanhamento. À Dra. Susana Ramos pelos conhecimentos transmitidos em todas as vertentes científicas, amizade e paciência.

Ao Dr. Stephane Besson pela sua ajuda na iniciação do conceito de *docking*.

À Dra. Susana Andrade por me ter recebido e disponibilizado o seu laboratório na Universidade de Freiburg, Alemanha. À Anja Wüst pelo seu acompanhamento permanente (quase exaustivo).

Às minhas duas colegas de gabinete/bancada, Patrícia Rodrigues e a Cláudia Nóbrega pelo acompanhamento constante nos bons e maus momentos, sem as suas loucuras esta tese não seria a mesma coisa, nem os dias passariam tão rápido sem as nossas tertúlias ... bons tempos que jamais esquecerei.

Ao magnífico grupo de investigação em que estive integrado neste ano, pelo seu companheirismo, auxílio laboratorial, pelos momentos de descontração proporcionados e até... por tudo mesmo, foram fantásticos.

E acima de tudo à minha família que fez todo o possível para que este momento chegasse. Mãe, pai e Simão, o vosso esforço, apoio, dedicação e compreensão estão gravados e já mais serão esquecidos. Tios, primos e madrinha por compreenderem as minhas ausências forçadas e apoio mais do que incondicional, muito obrigado.

E a si AVÓ, a luz minha vida que, pouco antes de este momento chegar, se ofuscou (porque nunca se apagará), continua e continuará a ser a minha razão de lutar todos os dias para alcançar os meus objectivos e depois imaginar os seus olhos lindos, de avó orgulhosa do seu neto. Como teria sido tão gratificante partilhar este momento consigo, mas a sua hora chegou antes e não deu para ficar mais tempo, compreendo. Contudo eu sei que esteja onde estiver, estará muito orgulhosa do meu trabalho e eu do seu “Laurinha”. Muito, muito obrigado.

Por fim, mas não menos importantes, aos amigos, aos verdadeiros amigos que tive ao meu lado nestes momentos mais atribulados, foram um grande apoio para que tudo fosse superado. Obrigado por me aturarem nos momentos de “resmunguice”, por compreenderem as ausências, acima de tudo por serem quem verdadeiramente são. O meu muito obrigado a todos vós.

## RESUMO

---

O citocromo  $cd_1$  NiR (cit.  $cd_1$ ) catalisa a conversão de nitrito a óxido nítrico na bactéria desnitrificante, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Consiste num homodímero de 120 kDa, sendo cada monómero constituído por dois domínios, um de transferência electrónica (hemo  $c$ ) e outro catalítico (hemo  $d_1$ ). Estudos anteriores mostraram que a actividade enzimática depende de uma pré-activação estrutural desencadeada pela entrada de electrões através do seu parceiro redox fisiológico [1].

Resultados obtidos por electroquímica mediada mostraram que a velocidade da reacção enzimática depende da natureza do parceiro redox, sendo o seu doador electrónico fisiológico, o cit.  $c_{552}$ , aquele que proporciona velocidades reaccionais mais elevadas. Com efeito, este foi o único agente redutor que permitiu observar actividade catalítica em condições saturantes de nitrito, segundo um mecanismo do tipo  $EC'$ . Nas situações em que se substituiu o cit.  $c_{552}$  por um mediador biológico (cit.  $c$  de coração de cavalo) ou químico (PMS, índigo carmine e fenosafranina), apenas se observou a existência de uma resposta catalítica para velocidades de varrimento muito baixas. Como tal, conclui-se que a velocidade de transferência electrónica intermolecular é muito mais lenta quando o parceiro redox do cit.  $cd_1$  não é o cit.  $c_{552}$ .

Apesar de não se ter conseguido determinar a estrutura cristalina da proteína em estudo no decurso desta tese, concluiu-se por modelação computacional, que esta apresenta uma elevada semelhança estrutural com a proteína de *Ps. aeruginosa*. Através do estudo bioinformático do acoplamento entre os pares enzima/parceiros redox biológicos (cit.  $c_{552}$  e cit.  $c$ ), não foi possível verificar diferenças nas interacções estabelecidas entre os dois intervenientes, assim como nas distâncias Fe-Fe entre os hemos  $c$  de ambos, contrariando os resultados obtidos por electroquímica. Este facto deve-se ao valor de pH a que foram determinadas as estruturas de proteína usadas neste estudo (pH 8,4) não corresponder ao usado nos ensaios electroquímicos (pH 6,3), não foi possível concluir sobre as diferenças de funcionalidade dos complexos cit.  $cd_1$  NiR/cit.  $c_{552}$  e cit.  $cd_1$  NiR/cit.  $c$  observadas experimentalmente (sabe-se que a constante de transferência intermolecular baixa drasticamente a partir de pH 7 [2]). Assim, com o estudo de *dockings* realizado entre os pares enzima/mediadores químicos, apenas se pôde avaliar a posição de interacção energeticamente favorável, não sendo possível distinguir o papel do agente redutor.

**Palavras-chave:** Citocromo  $cd_1$  NiR; Citocromo  $c_{552}$ ; Transferência electrónica intermolecular; Interação; Parceiro redox.





## ABSTRACT

---

The cytochrome *cd<sub>1</sub>* NiR (cyt. *cd<sub>1</sub>*) catalyzes the reduction of nitrite to nitric oxide in denitrifying bacteria, such as *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. It is a homodimer protein with 120 kDa; each monomer consists of two domains, the electron transfer (heme *c*) and the catalytic (heme *d<sub>1</sub>*) domain. Previous studies have demonstrated that the enzymatic activity depends on a structural pre-activation triggered by the entry of electrons through the physiological redox partner, cyt. *c<sub>552</sub>* [1].

The results obtained by mediated electrochemistry showed that the rate of enzymatic reaction depends on the nature of the redox partner. The cyt. *c<sub>552</sub>* provides the highest rate the reaction. Indeed, this was the only agent for which reductive catalytic activity was observed under nitrite saturating conditions, according to a mechanism of the type *EC'*. In situations where cyt. *c<sub>552</sub>* is replaced by a biological (cyt. *c* horse heart) or chemical mediator (PMS, indigo carmine and phenosafranine) the catalytic response was only observed at very low scan rates. As such, it is concluded that the intermolecular electron transfer rate is much slower when the redox partner of cyt. *cd<sub>1</sub>* is not cyt. *c<sub>552</sub>*.

Unfortunately it was not possible to determine the crystal structure of cyt. *cd<sub>1</sub>* during this thesis, nevertheless by computer simulation it was found that it has a high structural similarity to the protein from *Ps. aeruginosa*. Molecular docking simulations between the pairs cyt. *cd<sub>1</sub>* / cyt. *c<sub>552</sub>* or cyt. *c* did not show differences in the interactions, neither in the Fe-Fe distances between the hemes *c* of the two partners, which contrasts the results obtained by electrochemistry. The protein structures used in this study were determined at pH 8,4 which does not correspond to the pH used in the electrochemical tests (pH 6.3), therefore it was not possible to conclude about the differences in functionality of the complexes cyt. *cd<sub>1</sub>* NiR / cyt. *c<sub>552</sub>* and cyt. *cd<sub>1</sub>* NiR / cyt. *c* (it is known that the intermolecular transfer constant lowers drastically above pH 7 [2]). Thus, this docking study only allowed to evaluate if the protein interactions are energetically favorable, and does not enable to distinguish the role of the reducing agent.

**Keywords:** Cytochrome *cd<sub>1</sub>* NiR; Cytochrome *c<sub>552</sub>*; Intermolecular electronic transfer; Interaction; Redox Partner.



# ÍNDICE

---

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XXIII
ABREVIATURAS	XXV
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Ciclo do Azoto</b>	<b>1</b>
1.1.1 Impacto ambiental	3
1.2 <b>Redutases de nitrito</b>	<b>4</b>
1.2.1 Redutase de nitrito Citocromo <i>cd<sub>1</sub></i> – Considerações gerais	5
1.2.2 Citocromos <i>cd<sub>1</sub></i> NiRs – Estruturas Moleculares	7
1.2.3 Citocromos <i>cd<sub>1</sub></i> NiRs – características espectroscópicas	9
1.2.4 Parceiros redox fisiológicos e biológicos	10
1.2.5 Mediadores Químicos	12
1.3 <b>Transferência electrónica intramolecular e catálise</b>	<b>13</b>
1.4 <b>Transferência electrónica intermolecular</b>	<b>15</b>
1.5 <b>Objectivos Propostos</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>19</b>
2.1 <b>Purificação de Proteínas – Citocromo <i>cd<sub>1</sub></i> e Citocromo <i>c<sub>552</sub></i></b>	<b>19</b>
2.1.1.1 Materiais e reagentes	19

2.1.1.2	Métodos bioquímicos-----	20
2.1.1.3	Procedimentos experimentais – purificação citocromo $cd_1$ -----	21
2.1.1.4	Procedimentos experimentais – purificação citocromo $c_{552}$ -----	25
<b>2.2</b>	<b>Métodos Electroquímicos-----</b>	<b>26</b>
2.2.1.1	Reagentes -----	26
2.2.1.2	Preparação dos eléctrodos -----	27
2.2.1.3	Voltametria Cíclica-----	27
<b>2.3</b>	<b>Dockings-----</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Cristalografia-----</b>	<b>30</b>
2.4.1.1	Materiais e Reagentes -----	30
2.4.1.2	Procedimentos experimentais-----	30
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO-----</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Purificação de proteínas-----</b>	<b>31</b>
3.1.1	Purificação aeróbia -----	31
3.1.2	Purificação anaeróbia -----	35
3.1.3	Purificação citocromo $c_{552}$ -----	37
<b>3.2</b>	<b>Determinação da constante de absorvidade molar -----</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Determinação de parâmetros cinéticos-----</b>	<b>41</b>
3.3.1	Citocromo $c_{552}$ – $I_{máx}^{app}$ e $K_m^{app}$ -----	41
3.3.2	Citocromo $c$ – $I_{máx}^{app}$ e $K_m^{app}$ -----	43
<b>3.4</b>	<b>Determinação de constantes de transferência electrónica intermolecular -----</b>	<b>46</b>
3.4.1	Citocromo $c_{552}$ – Parceiro fisiológico putativo -----	46
3.4.2	Citocromo $c$ de coração de cavalo – Parceiro biológico-----	48
3.4.3	PMS -----	50
3.4.4	Índigo carmine -----	52
3.4.5	Fenosafranina -----	53
<b>3.5</b>	<b>Interação Enzima/Doador electrónico – Dockings-----</b>	<b>56</b>
3.5.1	Estrutura tridimensional de cit. $cd_1$ NiR de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> -----	56
3.5.2	Caso de estudo – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	62
3.5.2.1	Citocromo $cd_1$ NiR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /citocromo $c_{551}$ -----	62
3.5.2.2	Citocromo $cd_1$ NiR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /citocromo $c$ coração de cavalo-----	68
3.5.3	Citocromo $cd_1$ NiR de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> -----	71

3.5.3.1	Mediadores biológicos-----	72
3.5.3.2	Mediadores químicos-----	80
<b>3.6</b>	<b>Cristalografia-----</b>	<b>85</b>
3.6.1	Obtenção de cristais de citocromo <i>cd<sub>1</sub></i> NiR-----	85
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO -----</b>	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA -----</b>	<b>89</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.1- Esquema do ciclo biológico do azoto com referência aos processos de manutenção do equilíbrio dos vários compostos azotados na natureza, assim como as componentes biológicas que gerem esses processos. Adaptado de .....	1
Figura 1.2- Representação esquemática do ciclo biológico do azoto com referência ao número de oxidação do mesmo átomo central (círculos) nos vários compostos, bem como as enzimas que catalisam as reacções apresentadas de redução e oxidação. Destacam-se nesta classe as redutases de nitrato (Nar, Nap e Nas); as redutases de nitrito (Cu NiR, Cit cd <sub>1</sub> , NirB e Cc NiR) a redutase de óxido nítrico (Nor) e redutase de óxido nitroso (N <sub>2</sub> OR). Adaptado de [4] .....	2
Figura 1.3- Estruturas tridimensionais das proteínas pertencentes a classe das redutases do nitrito. Evidência à divisão segundo o critério do produto formado e subdivisão por cofactor. Adaptados de [12] .....	4
Figura 1.4- Representação da estrutura tridimensional da proteína cit. cd <sub>1</sub> NiR de Ps. aeruginosa (PDB: <b>1NIR</b> ) .....	5
Figura 1.5- Estruturas dos grupos prostéticos: A – hemo do tipo c, B – hemo do tipo d <sub>1</sub> . .....	6
Figura 1.6- Representação esquemática das interacções estabelecidas entre os grupos prostéticos e os aminoácidos coordenantes do átomo de ferro dos hemos c e d <sub>1</sub> , estando as proteínas: A e B- oxidada; C e D- reduzida; sendo a proteína proveniente de: A e C- P. pantotrophus; B e D- Ps. aeruginosa.....	7
Figura 1.7- Representação das estruturas tridimensionais de parceiros redox fisiológicos da proteína citocromo cd <sub>1</sub> de deferentes microrganismos. A – Citocromo c <sub>551</sub> de Ps. aeruginosa, B – Azurina de Ps. aeruginosa, C – Citocromo c de coração de cavalo, D – Citocromo c <sub>552</sub> de M. hydrocarbonoclasticus. ....	10
Figura 1.8- Mecanismo reaccional proposto da actividade catalítica da proteína citocromo cd <sub>1</sub> NiR. Propostas duas vias para a libertação da molécula de NO e consequente regeneração de proteína para um novo ciclo catalítico. Adaptado de [16].....	13
Figura 1.9- Representação esquemática de uma electroquímica mediada à superfície de um eléctrodo para proteínas da classe das redutases de nitrito. Adaptado de [12].....	16
Figura 1.10- Representação esquemática da reacção de catálise ocorrida à superfície do eléctrodo por electroquímica mediada. A proteína trata-se do cit. cd <sub>1</sub> NiR de M. hydrocarbonoclasticus, o parceiro redox é o cit. c <sub>552</sub> , estando estes imobilizados na superfície do eléctrodo, o substrato reacional permeia a matrix de imobilização , do meio reacional até à proteína, assim como o produto o faz no sentido opôs. Adaptado de [7, 21] .....	16

Figura 2.1- Esquema de purificação das proteínas cit. cd <sub>1</sub> NiR e cit. c <sub>552</sub> de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> em condições aeróbias. ....	22
Figura 2.2- Esquema de purificação em condições de anaerobiose das proteínas cit. cd <sub>1</sub> NiR e cit. c <sub>552</sub> de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> . ....	24
Figura 3.1- Espectro de UV/Visível da fracção de cit. cd <sub>1</sub> NiR após a coluna DE-52, cuja razão de pureza é 0,3; inserção de uma ampliação do espectro, na região dos cdo característicos da proteína. ....	31
Figura 3.2- Cromatograma da eluição do cit. cd <sub>1</sub> da coluna Source 15Q, com registo das densidades ópticas a 3 cdo: ____ 280 nm; __ __ 410 nm; - - - - 630 nm. ....	32
Figura 3.3- Cromatograma da eluição do cit.cd <sub>1</sub> da coluna Superdex 200, com registo das densidades ópticas a 3 cdo: ____ 280 nm; __ __ 410 nm; - - - - 630 nm. ....	33
Figura 3.4- Fracções resultantes da purificação de cit. cd <sub>1</sub> , após a etapa da exclusão molecular. A – espectro de UV/Visível da fracção mais pura (I <sub>1</sub> do gel SDS-PAGE) cuja Rp = 1,2; nos dois estados da oxidação: (- - - -) forma oxidada, (____) forma reduzida; e relevância para os máximos de absorção característicos da proteína; B – gel SDS-PAGE das várias fracções purificadas da proteína. ....	34
Figura 3.5- Gel SDS-PAGE das fracções purificadas em cada etapa cromatográfica e um gel corado para hemos da fracção final. M- marcador de pesos moleculares; A- fracção solúvel; B- fracção após DE-52; C- fracção após Source 15Q; D- fracção final (após Superdex 200); E- marcador de pesos moleculares colorido (hemos); F- fracção final corada para hemos (Rp=1,2). ....	34
Figura 3.6- Cromatograma da eluição do cit.cd <sub>1</sub> (segunda banda e de maior intensidade) da coluna DEAE fast flow, com registo da densidade óptica a 280 nm (____) e referência ao gradiente salino ( __ __ __ ). ....	35
Figura 3.7- Espectro de UV/Visível da fracção de cit. cd <sub>1</sub> NiR, após a coluna DEAE fast flow. ...	36
Figura 3.8- Géis SDS-PAGE das fracções purificadas em cada etapa cromatográfica. M- marcador de pesos moleculares; A- fracção solúvel; B- fracção após DEAE- fast flow; C- fracção após Hitrap; D- fracção final (após Superdex 200). ....	36
Figura 3.9- Cromatograma da eluição do cit. c <sub>552</sub> na coluna Superdex 75, com registo das densidades ópticas a 280 nm ....	37
Figura 3.10- Espectro de UV/Visível do cit. c <sub>552</sub> nos dois estados da oxidação: (- - - -) forma oxidada, (____) forma reduzida; e relevância para os máximos de absorção característicos da proteína. ....	38
Figura 3.11- Voltamogramas cíclicos da resposta enzimática, com adição de concentrações crescentes de nitrito (0 – 4,9 mM); a velocidade de varrimento constante (20 mV/s); com a	



proteína cit. $cd_1$ e o parceiro redox fisiológico, cit. $c_{552}$ imobilizados com membrana, em diferentes proporções estequiométricas (excesso de parceiro redox). A – proporção de 1:1; B – proporção de 1:2; C – proporção de 1:4. D – traçado das curvas de Michaelis-Menten para as várias proporções estequiométricas: ____ proporção 1:1; - - - proporção 1:2; _ _ _ proporção 1:4.....	42
Figura 3.12- Voltamogramas cíclicos da resposta enzimática, com adição de concentrações crescentes de nitrito (0 – 4,0 mM); a velocidade de varrimento constante (20 mV/s); com a proteína cit. $cd_1$ e o parceiro redox biológico, cit. c, de coração se cavalo imobilizados com membrana, em diferentes proporções estequiométricas (excesso de parceiro redox). A – proporção de 1:1; B – proporção de 1:2; C – proporção de 1:4. D – esboço das curvas de Michaelis- Menten para as várias proporções estequiométricas: ____ proporção 1:1; - - - proporção 1:2; _ _ _ proporção 1:4. ....	44
Figura 3.13- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s) com a proteína cit. $cd_1$ e o parceiro redox cit. $c_{552}$ (70 $\mu$ M) imobilizados com membrana. A – na ausência de nitrito, B – com excesso de nitrito (6 mM). ....	47
Figura 3.14- Representação da relação de dependência entre a intensidade do sinal com a concentração da proteína cit. $cd_1$ . A – $\lambda (I_{cat}/I_0)$ em função de $1/v$ para várias concentrações de proteína, B – relação de dependência do declive da recta em função da concentração de proteína cit. $cd_1$ . ....	47
Figura 3.15- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s) com a proteína cit. $cd_1$ e o parceiro redox cit. c de coração de cavalo (70 $\mu$ M) imobilizados com membrana. A – na ausência de nitrito, B – com excesso de nitrito (6 mM). ....	48
Figura 3.16- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit. $cd_1$ e o parceiro redox cit. c de coração de cavalo (70 $\mu$ M) imobilizados com membrana. A – a 5 mV/s, B – a 50 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (____), e com saturação de nitrito ( _ _ _ ) .....	49
Figura 3.17-Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s) com a proteína cit. $cd_1$ imobilizados com membrana e o mediador redox PMS (70 $\mu$ M) em solução. A – na ausência de nitrito, B – com saturação de nitrito (6 mM). ....	50
Figura 3.18- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit. $cd_1$ imobilizada com membrana e o mediador redox PMS (70 $\mu$ M), em solução. A – a 5 mV/s, B – a 200 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (____), e com saturação de nitrito ( _ _ _ ) .....	51
Figura 3.19- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s), com a proteína cit. $cd_1$ imobilizada com membrana e o mediador	

redox, índigo carmine (70 $\mu$ M), em solução. A – na ausência de nitrito, B – com saturação de nitrito (6 mM).....	52
Figura 3.20- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit. cd <sub>1</sub> imobilizada com membrana e o mediador redox índigo carmine (70 $\mu$ M), em solução. A – a 5 mV/s, B – a 200 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (___), e com saturação de nitrito (___).....	53
Figura 3.21 - Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a diferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s), com a proteína cit. cd <sub>1</sub> imobilizados com membrana e o mediador redox fenilalanina (70 $\mu$ M) em solução. A – na ausência de nitrito, B – com saturação de nitrito (6 mM).....	54
Figura 3.22- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit. cd <sub>1</sub> imobilizada com membrana e o mediador redox fenosafranina (70 $\mu$ M), em solução. A – a 5 mV/s, B – a 200 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (___), e com saturação de nitrito (___).....	54
Figura 3.23- Alinhamento de sequências de cit. cd <sub>1</sub> NiR, dos microrganismos: M. hydrocarbonoclasticus (H8WEU2), Ps aeruginosa (G8A456), Ps. stutzeri (I6WMF2) e P. pantotrophus (P72181).....	57
Figura 3.24- Modelos das estruturas tridimensionais de uma das subunidades estruturais (monómero), simulado pelo programa CHPmodels 3.2, para a proteína cit. cd <sub>1</sub> NiR de M. hydrocarbonoclasticus. A – estrutura proposta do “esqueleto” proteico, B – estrutura ajustada no programa UCSF Chimera 1.6.1. ....	58
Figura 3.25- Sobreposição das estruturas monomérica de cit. cd <sub>1</sub> NiR de Ps. aeruginosa (PDB: <b>1GJQ</b> ) a verde, com a estrutura simulada pelo programa CPHmodels 3.2, da mesma proteína mas de M. hydrocarbonoclasticus, a azul. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	59
Figura 3.26- Mapeamento da distribuição de cargas à superfície (potencial coulombiano) da estrutura simulada para: A e B - proteína cit. cd <sub>1</sub> NiR de M. hydrocarbonoclasticus e C e D - proteína cit. cd <sub>1</sub> NiR de Ps. aeruginosa; utilizando 4,0 como o valor da constante dielétrica: A e C– totalidade da estrutura, B e D – zoom em torno do hemo c. Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	60
Figura 3.27- Mapeamento de superfície da proteína cit. cd <sub>1</sub> NiR de M. hydrocarbonoclasticus. A – Vista do hemo do tipo c; B – vista superior do hemo do tipo d <sub>1</sub> ; C – vista inferior do hemo do tipo c. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	61
Figura 3.28- Representação do ranking das 100 interações mais favoráveis, entre cit. cd <sub>1</sub> NiR e o cit. c <sub>551</sub> , com dois estados de oxidação do parceiro redox, sendo a estrutura oxidada da proteína cit. cd <sub>1</sub> ; e para dois parâmetros de interação (global score e hidrofóbico). A e B – cit.	

c <sub>551</sub> na forma oxidada; C e D – cit. c <sub>551</sub> na forma reduzida; A e C – representação das interações hidrofóbica; B e D – representação do global score. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente. ....	63
Figura 3.29- Representação do ranking das 100 interações mais favoráveis do tipo hidrofóbico, entre cit. cd <sub>1</sub> NiR (nos diferentes estados de oxidação) e o cit. c <sub>551</sub> na sua forma oxidada. Cit. cd <sub>1</sub> NiR na sua forma: A – oxidada; B – reduzida com CN; C – reduzida com NO e D – semi-reduzida. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente. ....	64
Figura 3.30- Distribuição na cadeia polipeptídica da cit. cd <sub>1</sub> NiR e do cit. c <sub>551</sub> de Ps. aeruginosa dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. c <sub>551</sub> e a proteína, respectivamente. Resultados dos vários dockings do parceiro no estado oxidado e a enzima em diferentes estados de oxidação: A e E- oxidada, B e F- semi-reduzida, C e G- reduzida com CN, e D e H- reduzida com NO. Sendo a cadeia polipeptídica da cit. cd <sub>1</sub> NiR representada de A – D; e a cadeia polipeptídica do cit. c <sub>551</sub> representada de E – H. Diferenciado o tipo de interação por cores: Geométrica – azul, Global score – laranja e Hidrofóbico – cinza. ....	66
Figura 3.31- Representação do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com enzima/parceiro redox. As duas proteínas encontram-se nas suas formas oxidadas e o tipo de interações estabelecidas são hidrofóbicas. A – cit. cd <sub>1</sub> NiR; B - cit. c <sub>551</sub> ; C - distribuição de cargas à superfície (potencial coulombiano) da proteína cit. c <sub>551</sub> de Ps. aeruginosa, utilizando 4,0 como o valor da constante dielétrica. Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	67
Figura 3.32- Representação do ranking das 100 interações do tipo hidrofóbico mais favoráveis entre cit. cd <sub>1</sub> NiR (nos diferentes estados de oxidação) e o cit. c de coração de cavalo. Cit. cd <sub>1</sub> NiR na sua forma: A – oxidada; B – reduzida com CN; C – reduzida com NO e D – semi-reduzida. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente. ....	69
Figura 3.33- Distribuição, na cadeia polipeptídica da cit. cd <sub>1</sub> NiR de Ps. aeruginosa e do cit. c de coração de cavalo, dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. c e a proteína, respectivamente. Resultados dos vários dockings do parceiro e a enzima em vários estados de oxidação: A e E- oxidada, B e F- semi-reduzida, C e G- reduzida com CN, e D e H- reduzida com NO. Sendo a cadeia polipeptídica da cit. cd <sub>1</sub> NiR representada de A – D; e a cadeia polipeptídica do cit. c de coração de cavalo representada de E – H. Diferenciado o tipo de interação por cores: Geométrica- azul, Global score- laranja e Hidrofóbico- cinza. ....	70

Figura 3.34- Representação do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com o parceiro redox/ proteína. As duas proteínas encontram-se nas suas formas oxidadas e o tipo de interações estabelecidas são hidrofóbicas. A – cit. cd<sub>1</sub> NiR; B - cit. c de coração de cavalo; C- distribuição de cargas à superfície (potencial coulombiano) da proteína cit. c de coração de cavalo. Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1..... 70

Figura 3.35- Representação do ranking das 100 interações mais favoráveis entre cit. cd<sub>1</sub> NiR e o cit. c<sub>552</sub>, nas suas formas monomérica e dimérica; para três tipos de parâmetros de interação: global score, hidrofóbico e geométrico. A, C e E – mediador na forma dimérica; B, D e F – mediador na forma monomérica; A e B – representação do global score; C e D – representação das interações hidrofóbica; E e F – representação das interações geométricas. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente..... 73

Figura 3.36- Distribuição, na cadeia polipeptídica da cit. cd<sub>1</sub> NiR de e do cit. c<sub>552</sub> ambos provenientes de *M. hydrocarbonoclasticus*, dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. c<sub>552</sub> e a proteína, respectivamente. Resultados dos vários dockings do parceiro redox nas suas duas formas estruturais (mono- dimérica): A e C- monómero e B e D- dímero. Sendo a cadeia polipeptídica da cit. cd<sub>1</sub> NiR representada em A e B e a cadeia polipeptídica do cit. c<sub>552</sub> representada em C e D. Diferenciado o tipo de interação por cores: Geométrica- azul, Global score- laranja e Hidrofóbico- cinza..... 75

Figura 3.37- Representação do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com o mediador redox/ proteína. O tipo de interações estabelecido é hidrofóbico. Apresentam-se dois estudos de interação entre a proteína e o parceiro redox, este último nas formas monomérica e dimérica. A – coloração dos aa do cit. cd<sub>1</sub> NiR que interagem com cit. c<sub>552</sub> monomérico; B - coloração dos aa do cit. cd<sub>1</sub> NiR que interagem com cit. c<sub>552</sub> dimérico; C - coloração dos aa do cit. c<sub>552</sub> monomérico que interagem com a enzima; D – mapeamento de superfície do cit. c<sub>552</sub> monomérico, com a respectiva distribuição de cargas (constante dieléctrica de 4,0). Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas; E - coloração dos aa do cit. c<sub>552</sub> dimérico que interagem com a enzima. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. .... 75

Figura 3.38- Representação do ranking das 100 interações mais favoráveis entre cit. cd<sub>1</sub> NiR e o cit. c de coração de cavalo; apresentando-se os três tipos de parâmetros de interação: A– representação do global score; B– representação das interações hidrofóbicas; C– representação das interações geométricas. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro

redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente. ....	77
Figura 3.39- Distribuição, na cadeia polipeptídica da cit. cd <sub>1</sub> NiR de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> e do cit. c de coração de cavalo, dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. c e a proteína, respectivamente. A – cadeia polipeptídica da enzima cit. cd <sub>1</sub> NiR; e B – cadeia polipeptídica do parceiro redox, cit. c. Diferenciado o tipo de interacção por cores: Geométrica- azul, Global score- laranja e Hidrofóbico- cinza. ....	79
Figura 3.40- Representações do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com o parceiro redox/proteína, o tipo de interacções estabelecidas são hidrofóbicas. A – coloração dos aa do cit. cd <sub>1</sub> NiR que interagem com cit. c de coração de cavalo; B - coloração dos aa do cit. c que interagem com a enzima; C – Mapeamento de superfície do cit. c, com a respectiva distribuição de cargas (constante dieléctrica de 4). Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	79
Figura 3.41- Representação das 9 possíveis interacções entre o hemo c da enzima cit. cd <sub>1</sub> e o mediador químico, o PMS; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interacção: A- 5 moléculas com 5,3-5,6 kcal/mol, B- 2 moléculas 5,3 kcal/mol e C- 1 molécula 5,2 kcal/mol. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	81
Figura 3.42- Representação das 9 possíveis interacções entre o hemo c da enzima cit. cd <sub>1</sub> e o mediador químico, o índigo carmine; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interacção: A- 4 moléculas com 5,5-5,2 kcal/mol e B- 5 moléculas 5,2-5,0 kcal/mol. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	81
Figura 3.43- Representação das 9 possíveis interacções entre o hemo c da enzima cit. cd <sub>1</sub> e o mediador químico, a fenosafranina; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interacção: A- 4 moléculas com 5,6-6,8 kcal/mol, B- 2 moléculas 5,4-5,5 kcal/mol e C- 3 moléculas 5,3-5,4 kcal/mol. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	82
Figura 3.44- Representação das 9 possíveis interacções entre o hemo c da enzima cit. cd <sub>1</sub> e o mediador químico, o paraquat; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interacção: A- 5 moléculas, B- 3 moléculas e C- 1 moléculas. ....	82
Figura 3.45- Representação dos mediadores químicos distribuídos pela posições de interacção como cit. cd <sub>1</sub> (vista da superfície dos hemos c), sendo diferenciados cada um por uma cor: vermelho – PMS; verde – índigo carmine; roxo – fenosafranina; e amarelo – paraquat. Estando cada um presente nas posições: A/A' – PMS, fenosafranina, paraquat e/ índigo carmine; B – PMS e fenosafranina; C/C' – PMS, fenosafranana e/ índigo carmine; D-E – paraquat. As posições A/A'	

e as C/C' são equivalentes entre si, no monómero adjacente. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1. ....	83
Figura 3.46- Cristais de cit. cd1 de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> formados a partir dos Initial screens, com 15 mg/ml de proteína. ....	85
Figura 3.47- Cristais de cit. cd1 de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> formados a partir dos fines screens do Index H6 e do Index D10, com temperatura entre 25-28 °C e 15 mg/ml (126 µM) de proteína., fazendo referência às respectivas condições de cristalização. ....	86

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1- Valores máximos de absorvância dos espectros de UV/Visível do cit. $cd_1$ nas formas oxidada e reduzida. -----	9
Tabela 1.2- Valores máximos de absorvância dos espectros de UV/Visível do citocromo $c_{552}$ nas suas formas oxidada e reduzida.-----	12
Tabela 2.1- Mediadores químicos de transferência electrónica utilizados no estudo electroquímico do cit. $cd_1$ . -----	26
Tabela 3.1- Valores da constante de absorvidade molar para a proteína cit. $cd_1$ NiR de vários microrganismos, para a forma oxidada da proteína. Ref. [39] -----	39
Tabela 3.2-Valores do $\epsilon$ determinado experimentalmente para 3 cdo do monómero da proteína cit. $cd_1$ de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> . -----	40
Tabela 3.3- Valores das constantes cinéticas experimentais da enzima cit $cd_1$ NiR, com o cit. $c_{552}$ como parceiro redox de transferência electrónica. -----	43
Tabela 3.4- Valores das constantes cinéticas experimentais da enzima cit $cd_1$ NiR com o cit. c de coração de cavalo como parceiro redox de transferência electrónica. -----	45
Tabela 3.5- Análise dos resultados dos alinhamentos das sequências proteicas de cit. $cd_1$ de vários microrganismos. -----	57
Tabela 3.6- Combinações de proteína cit. $cd_1$ NiR e parceiro redox, cit. $c_{551}$ , em diferentes estados de oxidação, utilizadas na modelação dos dockings e os respectivos códigos do PDB. -----	62
Tabela 3.7- Valores médios das distâncias entre o átomo de Fe do hemo c do parceiro redox, o cit. $c_{551}$ e o Fe do hemo c da proteína cit. $cd_1$ NiR, de <i>Ps. aeruginosa</i> , dos “top 12” e “top 5”, para os diferentes estados de oxidação a enzima e para as diferentes categorias de interacção. ---	65
Tabela 3.8- Valores médios das distâncias entre o átomo de Fe do hemo c do parceiro redox, o cit. c e o Fe do hemo c da proteína cit. $cd_1$ NiR, de <i>Ps. aeruginosa</i> , dos “top 12” e “top 5”, para os diferentes estados de oxidação a enzima e para as diferentes categorias de interacção. -----	68
Tabela 3.9- Valores médios das distâncias, do “top 12” e do “top 5”, entre o átomo de Fe do hemo c do mediador, cit. $c_{552}$ (dímero e monómero) e o Fe do hemo do tipo c da proteína cit. $cd_1$ NiR de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , diferenciando-se várias categorias de interacção. -----	74
Tabela 3.10- Valores médios das distâncias do “top 12” e do “top 5” entre átomo de Fe do hemo c do parceiro redox, cit. c de coração de cavalo e o Fe do hemo do tipo c da proteína cit. $cd_1$ NiR de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , diferenciando-se várias categorias de interacção. -----	78
Tabela 3.11- Apresentação dos percursos electrónicos percorridos entre o doador e o hemo c da enzima, passando pelos vários aminoácidos com indicação das energias de acoplamento; para cada um dos mediadores tendo em conta o local de interacção na estrutura do cit. $cd_1$ . -----	84





## ABREVIATURAS

---

[S]	Concentração de substrato
1/v	Inverso da velocidade de varrimento
aa.	Aminoácido
Abs	Absorvância
Ala	Alanina
App	Aparente
Arg	Arginina
BCA	Ácido biciconínico
<i>BiGGER</i>	<i>Biomolecular Complex Generatoin with Global Evaluation and Ranking</i>
BSA	Albumina de soro bovino
Cdo	Comprimento de onda
Cit. c	Citocromo c
Cit. <i>c</i> <sub>551</sub>	Citocromo <i>c</i> <sub>551</sub>
Cit. <i>c</i> <sub>552</sub>	Citocromo <i>c</i> <sub>552</sub>
Cit. <i>cd</i> <sub>1</sub>	Citocromo <i>cd</i> <sub>1</sub>
Cys	Cisteína
<i>E</i>	Mecanismo electroquímico
<i>EC</i>	Mecanismo electroquímico com reação química associada
<i>EC'</i>	Mecanismo electroquímico com reação química irreversível associada
EDTA	Etilenodiaminatetraacetato de sódio
<i>E</i> <sup>o'</sup>	Potencial formal
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica
F	Constante de Faraday
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
<i>HPLC</i>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<i>I</i> <sub>cat</sub>	Intensidade da corrente no catalítico
Ile	Isoleucina
<i>I</i> <sub>p</sub>	Intensidade da corrente da constante heterogénea
<i>I</i> <sub>pa</sub>	Intensidade da corrente no pico anódico
<i>I</i> <sub>pc</sub>	Intensidade da corrente no pico catódico
K	Constante de velocidade de segunda ordem
<i>k'</i>	Constante de velocidade de pseudo-primeira ordem
<i>K</i> <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
Leu	Leucina
Lis	Lisina
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
Med	Mediador
MÊS	4-morfolimeetanosulfonato de sódio
Met	Metionina
<i>N</i>	Número de electrões transferidos

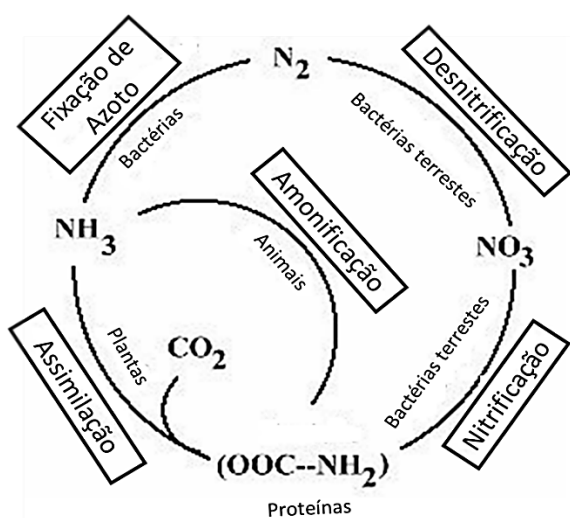
N <sub>2</sub> OR	Redutase do óxido nitroso
Nar	Redutase de nitrato
NHE	Eléctrodo de referência de hidrogénio
NiR	Redutase de nitrito
Nor	Redutase do óxido nítrico
Ox	Oxidado
<i>P. pantotrophus</i>	<i>Paranacoccus pantotrophus</i>
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
Phe	Fenilalanina
pI	Ponto isoeléctrico
PMS	Fenasina metil sulfato
Pro	Prolina
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Ps. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
R	Constante dos gases
RCSB	Research colloboratory for structural bioinformatics
Red	Reduzido
Ref.	Referência bibliográfica
<i>Rmsd</i>	<i>Root-mean-square deviation</i>
Rp	Razão de pureza
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio
T	Temperatura (K)
Thr	Trionina
TMBZ	3,3'5,5'-tetrametilbenzidina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
V	Velocidade de varrimento
v <sub>0</sub>	Velocidade da reacção
Val	Valina
VC	Voltamograma cíclico
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima da reacção
Vs	<i>Versus</i>
ΔE	Variação de potencial
E	Constante de absortividade molar
Λ	Razão I <sub>cat</sub> /I <sub>p</sub>

# Capítulo 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CICLO DO AZOTO

Muitos compostos inorgânicos são constituídos por um elemento central, sendo este imprescindível no crescimento, desenvolvimento e equilíbrio dos organismos vivos. Os ciclos biológicos são, por excelência, a forma de regeneração desses elementos, tornando-se indispensáveis para uma existência equilibrada dos diversos compostos em que o elemento se encontra na Natureza.

O azoto é o quinto elemento mais abundante na natureza [3] e um dos componentes essenciais das biomoléculas [4], tornando o seu ciclo num dos conjuntos de processos biológicos mais relevantes na regeneração de um elemento químico. Uma existência equilibrada dos diversos compostos azotados é mantida pelo ciclo biológico do azoto, o qual estabelece uma relação estável entre o azoto mineral e orgânico [5].



Este ciclo é gerido por diversos processos, como a fixação (podendo ser biológica, atmosférica e industrial), a assimilação, a amonificação, a nitrificação e a desnitrificação [1, 3]. A maioria destes processos é gerida biologicamente por diversos microrganismos (Figura 1.1).

Figura 1.1- Esquema do ciclo biológico do azoto com referência aos processos de manutenção do equilíbrio dos vários compostos azotados na natureza, assim como as componentes biológicas que gerem esses processos. Adaptado de <sup>1</sup>

As reacções que ocorrem no ciclo do azoto dizem respeito às alterações no número de oxidação deste mesmo elemento (Figura 1.2), existindo uma variação entre +V a -III [4]. Assim, as enzimas que catalisam estas reacções são denominadas por oxidoredutases e pertencem à classe EC1, uma vez que promovem transferências electrónicas entre compostos químicos [6], sendo nomeadas pela reacção que catalisam e pelo composto que utilizam como substrato da reacção.

<sup>1</sup> [http://www.starsandseas.com/SAS%20Ecology/SAS%20chemcycles/cycle\\_nitrogen.htm](http://www.starsandseas.com/SAS%20Ecology/SAS%20chemcycles/cycle_nitrogen.htm), em 25-06-13

Na Figura 1.2 apresentam-se as proteínas responsáveis pela manutenção de um dos ramos do ciclo do azoto, a desnitrificação, na qual este átomo central se encontra presente em diversos compostos com alteração do seu número de oxidação.

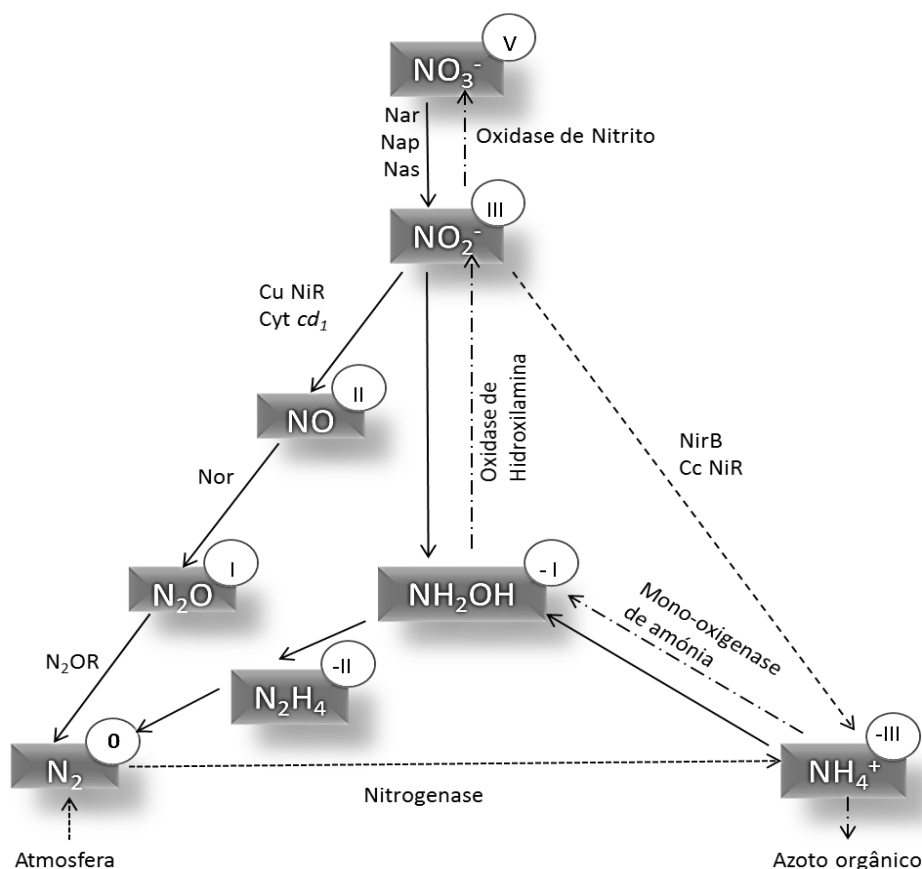


Figura 1.2- Representação esquemática do ciclo biológico do azoto com referência ao número de oxidação do mesmo átomo central (círculos) nos vários compostos, bem como as enzimas que catalisam as reacções apresentadas de redução e oxidação. Destacam-se nesta classe as redutases de nitrato (Nar, Nap e Nas); as redutases de nitrito (Cu NiR, Cyt cd<sub>1</sub>, NirB e Cc NiR) a redutase de óxido nítrico (Nor) e redutase de óxido nitroso (N<sub>2</sub>OR). Adaptado de [4]

A desnitrificação é um processo biológico através do qual o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é reduzido a azoto molecular (N<sub>2</sub>) mediante a passagem por intermediários reacionais, como são os casos do nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), da amónia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e do óxido nítrico (NO). A desnitrificação ocorre na ausência de oxigénio, tratando-se, por conseguinte, de um processo anaeróbio [4, 6]. A ausência de oxigénio é determinante no processo de desnitrificação, pois só nesta condição é que os N-óxidos se tornam em aceptadores favoráveis de electrões [8]; caso contrário, o oxigénio é o aceptador preferencial.

Das enzimas responsáveis pelo processo de desnitrificação destacam-se as redutases, as quais se dividem em quatro categorias, mediante o substrato que reduzem, a saber, as redutases de nitrato (Nar), nitrito (NiR), óxido nítrico (Nor) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>OR) [7].

### 1.1.1 Impacto ambiental

A existência de alguns compostos azotados (nos quais se incluem os nitratos e os nitritos) em excesso na Natureza aumenta a poluição ambiental, bem como a contaminação de vários ecossistemas. Assim, todos os meios que promovam a redução desses compostos são uma mais-valia para a melhoria da qualidade ambiental [4].

O aparecimento de quantidades excessivas de nitratos e nitritos pode dever-se à actividade humana, pela sua utilização abusiva em fertilizantes azotados na agricultura e a nível de aplicações industriais (por exemplo: conservação de alimentos, tintas, etc.); à conversão fotoquímica dos óxidos de azoto formados pela produção de gases, resultantes de vários processos de combustão (tanto industriais como domésticos) [9].

Como todos os compostos existentes em concentrações excessivas, também estes se tornam em contaminantes, sempre que os métodos biológicos de remoção ou conversão sejam pouco eficientes na sua capacidade de resposta. Os nitritos e nitratos provocam, através de infiltrações nos solos, a contaminação dos mesmos e, por conseguinte, dos lençóis freáticos [3]. Ao entrarem na circulação aquática, estes compostos proliferam como contaminantes da fauna e entram na cadeia alimentar, através da sua absorção por peixes e mariscos. Como elemento integrante da cadeia alimentar, também o ser humano será afectado [9].

A ingestão de nitratos pelo ser humano é recorrente, uma vez que estes fazem parte da constituição de grande parte das plantas, sendo estas um dos elementos participantes no ciclo do azoto (Figura 1.1). Já os nitritos são compostos ingeridos a partir de produtos processados, como carnes curadas, peixes ou queijos, pois estes compostos são utilizados nos métodos de conservação de alimentos. No entanto, e tal como no meio ambiente, a sua ingestão só se torna nociva quando em excesso [10]. Os nitritos, quando na corrente sanguínea, podem assumir um papel patológico visto que possuem a capacidade de se coordenar, irreversivelmente, à hemoglobina, oxidando-a a metahemoglobina; nesta última não pode ligar a molécula de oxigénio e proceder ao seu transporte no sangue. Contudo, estas situações apenas ocorrem para concentrações muito elevadas de nitrito [11].

Pelo acima exposto, entende-se a importância de estudar estruturas biológicas que, como no caso particular desta tese, permitam a conversão destes compostos (nitritos e nitratos), noutros com um papel menos nocivos.

## 1.2 REDUTASES DE NITRITO

As redutases de nitrito são uma categoria de proteínas que catalisam a redução de nitrito por duas vias distintas, uma é denominada por *ammonia forming* (produtoras de amónia), originando como produto final da reacção amónia ( $\text{NH}_4^+$ ); a outra via denomina-se por *NO forming* (produtoras de óxido nítrico) sendo o produto final da reacção o óxido nítrico (NO) [12].

As duas categorias de redutases de nitrito mencionadas podem também ser subdivididas tendo em conta o tipo de cofactor que as caracteriza [12]. Estes dois tipos de divisão individualizam as proteínas em citocromo c NiR, sirohémica NiR, citocromo *cd*<sub>1</sub> NiR (cit. *cd*<sub>1</sub>) e centros de cobre NiR, tal como esquematizado na Figura 1.3.

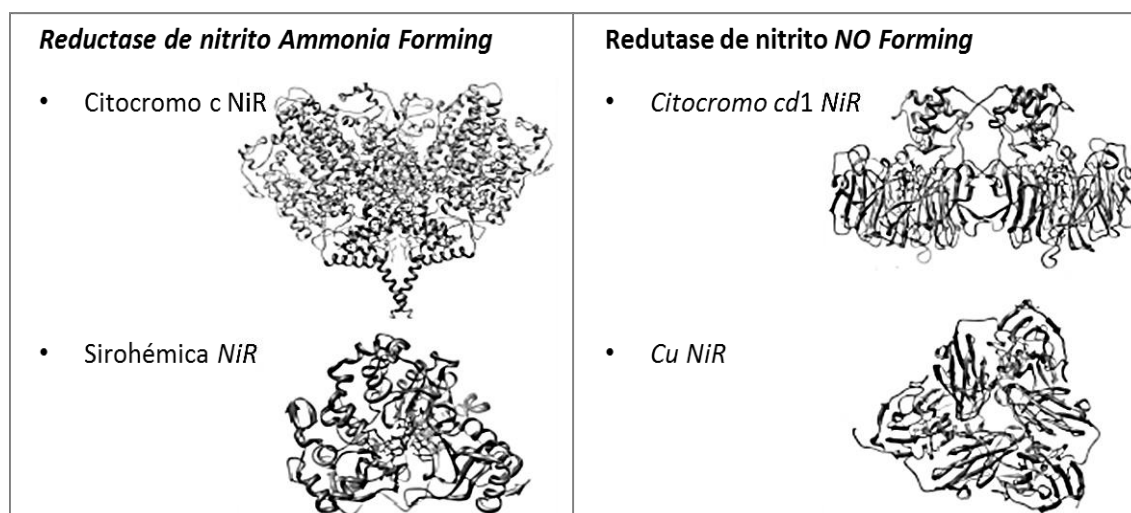
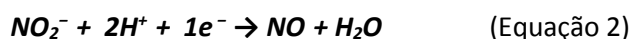
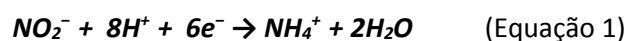


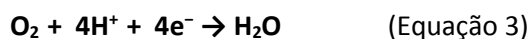
Figura 1.3- Estruturas tridimensionais das proteínas pertencentes a classe das redutases do nitrito. Evidência à divisão segundo o critério do produto formado e subdivisão por cofactor. Adaptados de [12]

As duas reacções de catálise são descritas pela equação 1, no caso de se tratar de uma proteína da categoria de *ammonia forming*, ou pela equação 2, quando a proteína em questão se trata de uma *NO forming* [12].



Como se pode observar, no caso da categoria de *ammonia forming*, as enzimas permitem a transferência de 6 electrões na conversão de uma molécula de  $\text{NO}_2^-$  em  $\text{NH}_4^+$  [8, 9].

Pela equação 2 constata-se que as proteínas da categoria de *NO forming* envolvem, na sua catálise, a transferência de apenas 1 electrão por molécula de nitrito convertida [2, 4, 11]. Estas proteínas, quando na presença de oxigénio, promovem também a catálise deste a molécula de água, reacção na qual se encontra envolvida a transferência de 4 electrões por molécula convertida, tal como se observa na equação 3 [15].



### 1.2.1 Redutase de nitrito Citocromo *cd*<sub>1</sub> – Considerações gerais

Das diferentes redutases de nitrito apresentadas anteriormente, o presente trabalho debruçou-se apenas sobre o cit. *cd*<sub>1</sub> NiR, que, como já mencionado, se trata de uma proteína *NO forming*. Esta enzima encontra-se presente em diversas bactérias desnitrificantes, estando referenciado o seu isolamento a partir de *Paracoccus desnitrificans*, *Paracoccus pantotrophus* (*P. pantotrophus*), *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas stutzeri* (*Ps. stutzeri*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (*M. hydrocarbonoclasticus*) [1, 4, 12, 13], entre outros, estando as estruturas tridimensionais e os mecanismos catalíticos mais caracterizados nos casos da proteína provenientes de *Ps. aeruginosa* [14, 15] e de *P. pantotrophus* [16, 17].

A proteína em estudo nesta tese é proveniente da bactéria desnitrificante marinha *M. hydrocarbonoclasticus*, a qual, após diversos estudos de filogenia se concluiu tratar da única da espécie do género *Marinobacter* registada. Em algumas fontes bibliográficas consultada, esta bactéria encontra-se referida também como *Pseudomonas nautica* 617 ou por *Marinobacter aquaeolei*; contudo, em 2005, chegou-se à conclusão de que todas se tratam à mesma bactéria, *M. hydrocarbonoclasticus* [18, 19].

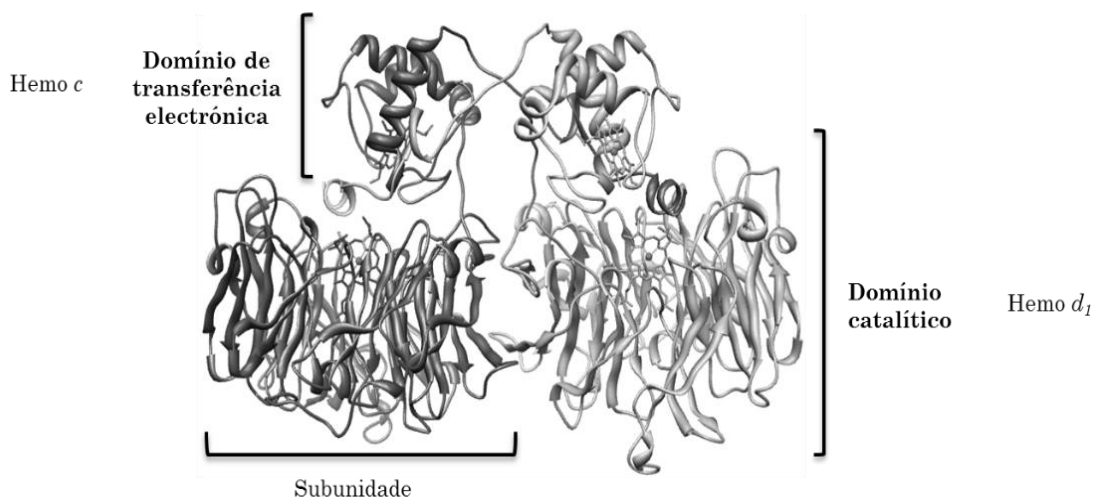


Figura 1.4- Representação da estrutura tridimensional da proteína cit. *cd*<sub>1</sub> NiR de *Ps. aeruginosa* (PDB: **1NIR**)

A redutase de nitrito cit. *cd<sub>1</sub>* é um homodímero com 60 kDa por subunidade. Alberga na sua estrutura dois domínios distintos, um de transferência electrónica, mais pequeno (cerca de 11 kDa), no qual se encontra acomodado um hemo do tipo *c*, tratando-se o segundo do domínio catalítico, de maiores dimensões (cerca de 48 kDa), onde se observa a existência de um hemo do tipo *d<sub>1</sub>* (Figura 1.4) [2, 26]. Cada um dos hemos possui uma funcionalidade específica na catálise enzimática. O hemo do tipo *c* (Figura 1.5- A) liga-se à proteína através de ligações covalentes estabelecidas pelos átomos de enxofre, enquanto no hemo do tipo *d<sub>1</sub>* a interacção é do tipo não covalente.

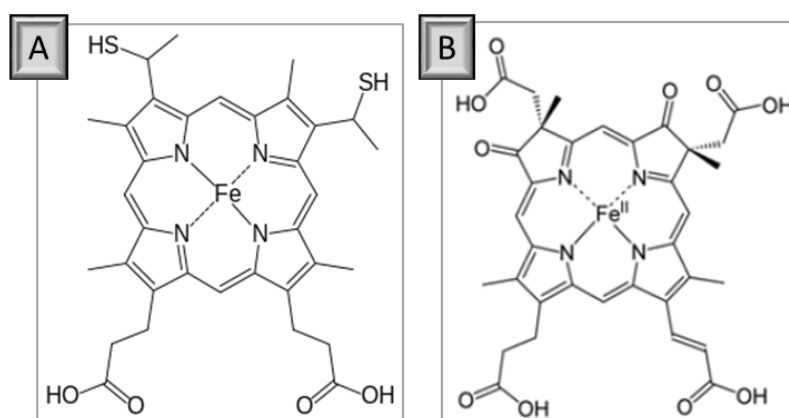


Figura 1.5- Estruturas dos grupos prostéticos: A – hemo do tipo *c*, B – hemo do tipo *d<sub>1</sub>*.

O hemo do tipo *d<sub>1</sub>* (Figura 1.5- B) é característico desta proteína [13], sendo apenas sintetizado por uma via especializada presente em organismos desnitrificantes [23]. Estruturalmente, este grupo prostético é uma 3,8-dioxo-17acrilato-profirindiona [11, 21], o qual possui um átomo de ferro hexacoordenado. Este átomo altera o seu estado de oxidação mediante a coordenação que apresente. Este tipo de hemo diferencia-se dos demais por possuir dois anéis de pirrolo saturados e dois grupos electropositivos, como são os casos do grupo carbonilo e do grupo carboxilato [1].

Este grupo hémico possui a capacidade de dissociar a ligação da molécula de NO ligada ao átomo de ferro (Fe – NO), o que não ocorre com os hemos do tipo *b* [16], os mais semelhantes estruturalmente a este cofactor.



### 1.2.2 Citocromos $cd_1$ NiRs – Estruturas Moleculares

Como foi referido anteriormente, o cit.  $cd_1$  NiR, proveniente de alguns microrganismos, já se encontra amplamente estudado, como são os casos de *Ps. aeruginosa* e de *P. pantotrophus* [1]. Apresentam-se, de seguida, os aspectos mais relevante, quer a nível estrutural, quer a nível mecanístico.

No caso da proteína de *P. pantotrophus*, foi possível verificar que cada uma das suas subunidades proteicas se divide em dois domínios: o mais pequeno (resíduos aa. 1-134) [1] está situado na região do N-terminal [26] e é maioritariamente composto por hélices  $\alpha$ , neste domínio encontra-se acomodado o grupo hémico do tipo *c*, ligado axialmente à His-17 e na posição proximal à His-69 [12, 14], é também conhecido como o domínio de transferência electrónica. O segundo domínio, presente na região do C-terminal, é composto predominantemente por folhas  $\beta$  e trata-se do de maior dimensão (resíduos aa. 135-567) [26]; alberga um hemo do tipo  $d_1$ , o qual se encontra localizado centralmente na estrutura apo-proteica. Para estabilizar este grupo prostético na estrutura da proteína, o átomo de ferro deste liga-se à His-200 do próprio domínio, o catalítico, e com a Tyr-25 do domínio de transferência electrónica (Figura 1.6- A).

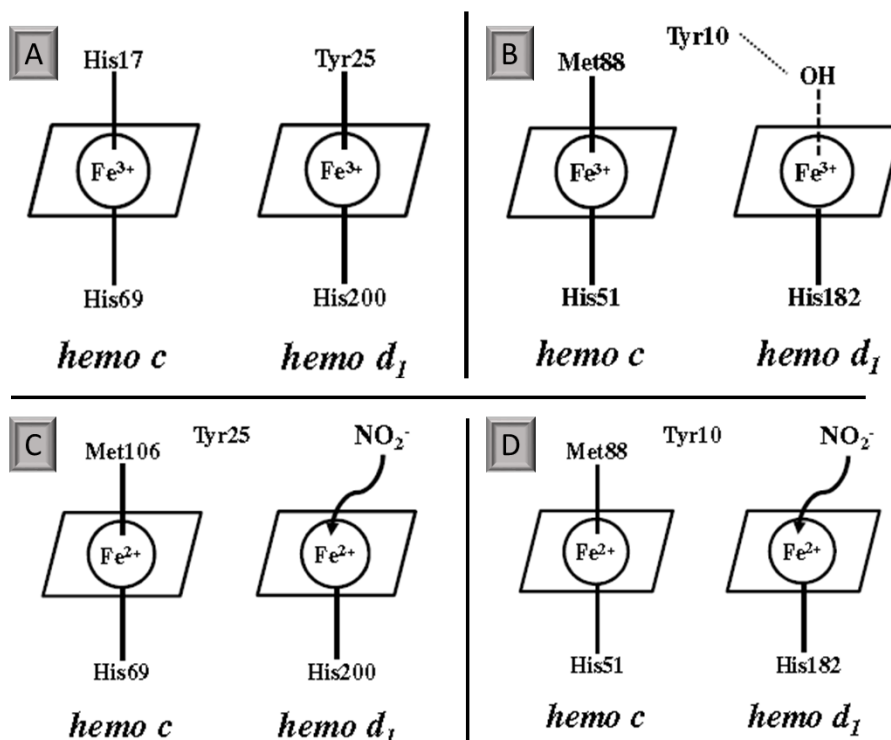


Figura 1.6- Representação esquemática das interações estabelecidas entre os grupos prostéticos e os aminoácidos coordenantes do átomo de ferro dos hemos *c* e  $d_1$ , estando as proteínas: A e B- oxidada; C e D- reduzida; sendo a proteína proveniente de: A e C- *P. pantotrophus*; B e D- *Ps. aeruginosa*.

Para a proteína proveniente de *Ps. aeruginosa*, e tal como se pode observar na Figura 1.6-B, os aminoácidos que estabelecem interacção entre o grupo prostético do tipo *c* e a estrutura proteica tratam-se da His-51 na posição proximal e Met-88 na posição axial [1]. Quanto ao grupo hémico do tipo *d<sub>1</sub>*, este interage com a His-182 e o ligando axial para este cofactor da proteína trata-se de um ião hidroxilo, mantendo-se na proximidade a Tyr-10, a qual não é estruturalmente equivalente à Tyr-25 de *P. pantotrophus* [27], ou seja, não se coordena com o hemo *d<sub>1</sub>* como acontece com a Tyr-25.

Apesar de algumas diferenças estruturais entre as duas proteínas, as posições relativas dos grupos prostéticos mantêm-se semelhante [27]. Como forma de reforçar a estabilidade da estrutura proteica, assim como para manter a união dos dois domínios distintos, estes estabelecem entre si cerca de 20 pontes de hidrogénio, as quais permitem manter uma distância entre os dois grupos prostéticos, dentro de cada subunidade, cerca de 11 Å na proteína de *P. pantotrophus* e 11,4 Å na proteína de *Ps. aeruginosa* [14, 20-21].

A nível estrutural, e no que se refere ao estado de oxidação em que se encontra durante o seu ciclo catalítico, o cit. *cd<sub>1</sub>* é muito versátil, isto é, ocorrem alterações conformacionais da estrutura. Aquando da redução da proteína, ocorre uma diminuição da percentagem de folhas  $\beta$  comparativamente à forma oxidada (48% para 35%). Também a estabilidade térmica é influenciada pelo estado de oxidação da proteína, uma vez que esta é mais instável termicamente no seu estado activo, ou seja, reduzido [1]. Existem, ainda, diferenças de estrutura entre estados de oxidação ao nível dos ligandos que se encontram coordenados aos átomos de ferro dos dois hemos. Assim, para a proteína de *P. Pantotrophus*, a His-17, que se encontra coordenada ao hemo *c*, é substituída pela Met-106, enquanto a Tyr-25 é descoordenada do hemo *d<sub>1</sub>*, passando o hemo a estar pentacoordenado no estado reduzido, permitindo assim a ligação à molécula de nitrito.

No caso da proteína de *Ps. aeruginosa*, a alteração das coordenações axiais nos dois hemos é menos significativa que na situação anterior, visto que apenas o grupo hidroxilo se descoordena (sob a forma de molécula de água), de modo a que, no estado reduzido, o átomo de ferro esteja pentacoordenado [27]. Importa ainda salientar que um *loop* do domínio que acomoda o hemo *c* (resíduos de aminoácidos 99-162 na *P. pantotrophus* e 56-62 na *Ps. aeruginosa*) se move aquando da redução do hemo *d<sub>1</sub>*, o que desencadeia a redução subsequente também do hemo *c* [27].

A nível de estrutura primária, a proteína de *M. hydrocarbonoclasticus* possui uma elevada semelhança entre a proteína de *P. pantotrophus* e de *Ps. aeruginosa* [13, 16, 23].

### 1.2.3 Citocromos $cd_1$ NiRs – características espectroscópicas

Uma das formas mais simplificada de caracterizar e/ou identificar uma proteína, assenta na espectroscopia de UV/Visível. Através desta técnica é possível verificar a existência de bandas de absorção a determinados comprimentos de onda (cdo) caracterizadas pelos seus máximos de absorção. Estes são dependentes da composição proteica, bem como dos grupos prostéticos existentes e dos seus respectivos estados de oxidação. A proteína cit.  $cd_1$  NiR é caracterizada pela existência de bandas de absorção, na sua forma oxidada, a 409 nm (banda *Soret*) e a 521 nm (banda  $\beta$ ) referentes ao hemo *c*; o hemo  $d_1$  contribui com uma banda a 636 nm (banda  $\alpha$ ). No seu estado reduzido, as bandas que são registadas ocorrem a 416 nm (banda *Soret*), a 521 nm (banda  $\beta$ ) e a 548/552 nm (*split  $\alpha$* ); verifica-se, assim, um desvio dos máximos da primeira banda e o aparecimento de uma terceira, todas elas referentes ao hemo do tipo *c*. Para o grupo hémico  $d_1$ , o máximo da banda  $\alpha$  desvia-se para 629 nm e existe o aparecimento de um pequeno ombro da banda  $\gamma$  a 460 nm [28].

Tabela 1.1- Valores máximos de absorvância dos espectros de UV/Visível do cit.  $cd_1$  nas formas oxidada e reduzida.

Tipo de Banda	Grupo Hémico	cdo (nm) Forma oxidada	cdo (nm) Forma reduzida
Banda $\alpha$	Hemo $d_1$	<b>636</b>	<b>629</b>
<i>Split <math>\alpha</math></i>	Hemo <i>c</i>	-	<b>548/552</b>
Banda $\beta$	Hemo <i>c</i>	<b>521</b>	<b>522</b>
Banda $\gamma$	-	-	<b>460</b>
Banda <i>Soret</i>	Hemo <i>c</i>	<b>409</b>	<b>416</b>
Aminoácidos aromáticos		<b>280</b>	<b>280</b>

O estado de spin do hemo  $d_1$  da proteína de *Ps. aeruginosa* foi avaliado por espectroscopia de EPR (do inglês: *Electron paramagnetic resonance*; Ressonância Paramagnética Electrónica), através da qual foi possível verificar a influência do estado de oxidação do cit.  $cd_1$ , bem como corroborar a existência de uma alteração conformacional entre estados de oxidação e a coordenação existente. Assim, verifica-se que, quando a proteína se encontra reduzida, o estado de spin do hemo  $d_1$  é *high spin* enquanto para o estado oxidado da proteína este é *low spin* [1].

#### 1.2.4 Parceiros redox fisiológicos e biológicos

Para o caso da proteína cit.  $cd_1$  NiR de *Ps. aeruginosa* foram propostos dois parceiros redox que promovem a transferência electrónica, sendo considerados como os doadores fisiológicos de electrões: o citocromo  $c_{551}$  e a azurina [13, 16, 25]. Para a mesma proteína de *P. pantotrophus*, o parceiro redox associado como fisiológico é o monómero de citocromo  $c_{550}$ . Já para o cit.  $cd_1$  de *M. hydrocarbonoclasticus* o doador de electrões é a proteína dimérica citocromo  $c_{552}$ , a qual é expressa pelo mesmo microrganismo, encontrando-se em elevadas quantidades no periplama [7].

Na Figura 1.7 apresentam-se as estruturas tridimensionais depositadas na base de dados PDB (do inglês: Protein Data Base) dos parceiros redox fisiológicos da proteína cit.  $cd_1$  NiR de *Ps. aeruginosa* e de *M. hydrocarbonoclasticus*, e um parceiro biológico mas não fisiológico, o citocromo  $c$  de coração de cavalo.

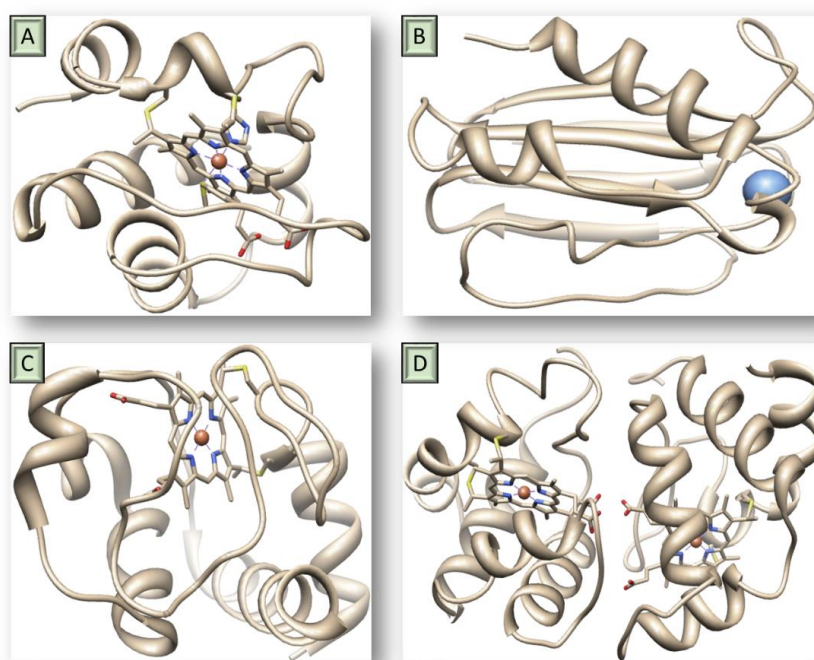


Figura 1.7- Representação das estruturas tridimensionais de parceiros redox fisiológicos da proteína citocromo  $cd_1$  de diferentes microrganismos. A – Citocromo  $c_{551}$  de *Ps. aeruginosa*, B – Azurina de *Ps. aeruginosa*, C – Citocromo  $c$  de coração de cavalo, D – Citocromo  $c_{552}$  de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Como mencionado anteriormente, na bactéria *Ps. aeruginosa* existem duas proteínas que são parceiros redox do cit.  $cd_1$ ; no entanto existe uma maior afinidade para o cit.  $c_{551}$ , em detrimento da azurina (Figura 1.7- A e B). Uma das razões pela preferência pelo cit.  $c_{551}$  é o facto das interacções existentes entre a enzima e os parceiros redox diferirem, ou seja, o cit.  $cd_1$  e o

cit. *C<sub>551</sub>* interactuam através de interacções electroestáticas, enquanto no caso da azurina essas interacções prevê-se que sejam do tipo hidrofóbico [16, 25]. A disponibilidade de parceiros redox na célula não é um passo limitante da reacção pois estas proteínas são expressas no periplasma em quantidades muito superiores ao valor do  $K_m$  (cerca de 1 mM) para a reacção de catálise [1].

O cit. *C<sub>551</sub>* é uma proteína mono-hémica com cerca de 9 kDa, que possui acomodado na sua estrutura um hemo do tipo *c*, sendo este o cofactor que, por se encontrar exposto na superfície da proteína, permite a troca de electrões com o cit. *cd<sub>1</sub>* [16, 25]. Esta proteína é maioritariamente composta por resíduos de aminoácidos ácidos, pelo que tem um ponto isoeléctrico de 4,7 [13, 26].

O citocromo *C<sub>552</sub>* é uma proteína dimérica proveniente da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*, na qual cada monómero possui uma massa molecular de 11 kDa, acomodando em cada, um grupo hémico de tipo *c*, sendo este cofactor que doa electrões ao cit. *cd<sub>1</sub>* [31]. No dímero proteico, os dois grupos hémicos encontram-se em posições adjacentes, sendo a distância dos dois átomos de Fe hémicos de cerca de 18,9 Å [7]

Esta proteína caracteriza-se por quatro hélices  $\alpha$  em cada monómero, que envolvem o hemo, ficando apenas uma parte do cofactor exposta ao solvente. Uma vez que o grupo prostético é do tipo *c*, este encontra-se ligado covalentemente à proteína, através de duas pontes dissulfureto estabelecidas com as Cys-14 e a Cys-17. O átomo de Fe do hemo encontra-se coordenado com a His-18 e a Met-60 [7].

Esta proteína é apresentada como sendo o parceiro redox fisiológico para a proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*; contudo não o é exclusivamente para esta enzima mas também para a *N<sub>2</sub>OR* (redutase do óxido nitroso) do mesmo microrganismo [32].

Num espectro de absorção de UV/Visível é possível verificar a existência de bandas características da proteína com a existência de máximos a determinados comprimentos de onda. Para a forma nativa da proteína (oxidada) esta apresenta os máximos de absorção a 412 nm (banda *Soret*) e a 525 nm (banda  $\beta$ ) referentes ao seu hemo *c*. Aquando da sua redução, estas apresentam desvios da banda *Soret* para 417 nm, da banda  $\beta$  a 522 nm e surge um máximo de banda a 552 nm referente ao *split  $\alpha$*  [5, 28], sendo este último o cdo que atribui o nome à proteína.

**Tabela 1.2-** Valores máximos de absorvância dos espectros de UV/Visível do citocromo  $C_{552}$  nas suas formas oxidada e reduzida.

Tipo de Banda	Grupo Hémico	cdo (nm) Forma oxidada	cdo (nm) Forma reduzida
Split $\alpha$	hemo c	-	<b>552</b>
Banda $\beta$	hemo c	<b>525</b>	<b>522</b>
Banda Soret	hemo c	<b>412</b>	<b>417</b>
Proteínas		<b>280</b>	<b>280</b>

### 1.2.5 Mediadores Químicos

A utilização de mediadores químicos precursores de transferência electrónica é uma forma alternativa à utilização de componentes biológicos para o desenvolvimento do mesmo papel reacional *in vitro*. Através de ensaios desenvolvidos com diversas proteínas, verificou-se que para a grande maioria das situações, este género de elementos químicos promovem as reacções de forma eficiente [34]. No caso do cit.  $cd_1$  NiR verificou-se que, aquando da utilização do PMS (do inglês, *Phenazinium, 5-methyl sulfat*; fenasina metil sulfato) como mediador electrónico, o produto final da reacção é o NO, portanto o produto originado biologicamente [1]. Desde que os compostos utilizados possuam potenciais próximos dos parceiros redox da proteína, estudos indicam que o produto final da reacção seja comum ao fisiológico [1]. No entanto, há situações em que o mediador químico não pode substituir o parceiro redox fisiológico, pois este último tem uma especificidade para a enzima e condiciona as alterações estruturais para a tornar activa.

### 1.3 TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA INTRAMOLECULAR E CATÁLISE

Como referido anteriormente, a redutase de nitrito cit.  $cd_1$  possui dois domínios distintos com papéis funcionais próprios, ou seja, o hemo  $c$  promove a transferência electrónica, enquanto o hemo  $d_1$  promove a catálise de nitrito a óxido nítrico. Para que a reacção ocorra é necessário que a proteína se encontre na sua forma activa (reduzida), e como se mencionou anteriormente, neste estado de oxidação o átomo de ferro hémico está pentacoordenado, permitindo, assim, que a molécula de nitrito se ligue à posição deixada livre no hemo  $d_1$ .

Como o cit.  $cd_1$  NiR pertence à classe das oxidoredutases, mais especificamente catalisando reacções de redução dos seus substitutos, o mecanismo catalítico tem início com a própria redução da enzima, através de doadores electroactivos, os quais devem interaccionar em primeiro lugar. Este passo de transferência electrónica designa-se por transferência electrónica intermolecular. Em geral, admite-se que o cofactor que recebe os electrões externos seja o hemo  $c$ , o qual deverá, subsequentemente, “entregá-los” ao hemo  $d_1$ ; neste caso, está-se perante uma transferência electrónica intramolecular, a qual é acompanhada de alterações estruturais essenciais à activação da enzima cit.  $cd_1$ .

Dos dois mecanismos mencionados, a transferência electrónica intramolecular é aquela cujo estudo se encontra mais aprofundado [11, 16, 26], sendo proposto neste trabalho uma abordagem mais específica da etapa da transferência electrónica intermolecular.

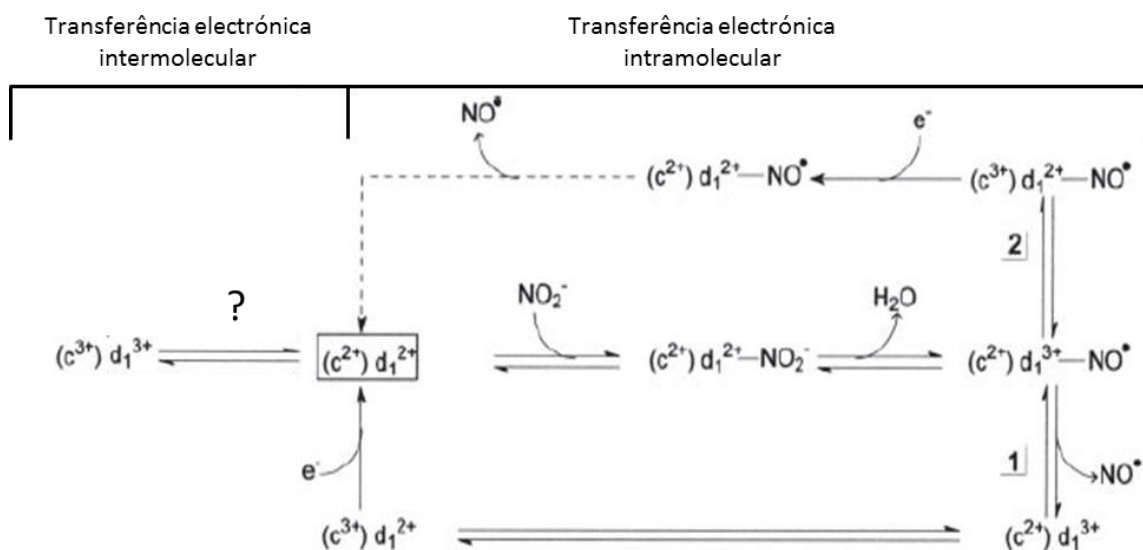


Figura 1.8- Mecanismo reaccional proposto da actividade catalítica da proteína citocromo  $cd_1$  NiR. Propostas duas vias para a libertação da molécula de NO e consequente regeneração de proteína para um novo ciclo catalítico. Adaptado de [16].

Na Figura 1.8 apresenta-se um mecanismo da reacção desenvolvida pela proteína ao longo do seu ciclo de catálise.

A transferência electrónica intermolecular trata-se do primeiro passo para se iniciar a actividade catalítica da proteína cit.  $cd_1$  NiR; nesta etapa ocorre a transferência de electrões para o cit.  $cd_1$ , proporcionando a alteração de seu estado de oxidação para a forma reduzida, sendo esta a forma activa. Após a proteína se encontrar na sua forma totalmente reduzida  $[(c^{2+})d_1^{2+}]$ , liga-se uma molécula de  $NO_2^-$  ao hemo  $d_1$ , na sua forma pentacoordenada. Seguidamente ocorre a protonação do complexo, promovendo a libertação de uma molécula de água [11, 16], levando posteriormente à formação de uma espécie intermediária com uma ligação a um ião nitrosilo  $[(c^{2+})d_1^{3+}-NO]$ , sendo esta primeira etapa relativamente rápida. [1].

O passo seguinte do mecanismo consiste na libertação do ião nitrosilo sob a forma de molécula de NO e, consequentemente, permitindo a regeneração da proteína para um novo ciclo catalítico [16]. Para explicar este processo, encontram propostas, na literatura, duas vias mecanísticas.

A primeira via (1) consiste na libertação da molécula de NO e posterior redução do hemo  $d_1$ , dando origem à espécie  $[(c^{3+})d_1^{2+}]$  [1]. Seria expectável que este passo fosse limitante para a velocidade da reacção, uma vez que a molécula de NO possui uma elevada afinidade para o átomo de  $Fe^{3+}$  comparativamente ao  $Fe^{2+}$ , tal como se observa noutras proteínas hémicas (mioglobina e hemoglobina). Contudo, no caso do hemo do tipo  $d_1$  tal não ocorre, sendo esta dissociação muito rápida [16]. Para a total regeneração da proteína na sua forma activa  $[(c^{2+})d_1^{2+}]$  e, consequentemente, para a realização de um novo ciclo catalítico, é necessário que ocorra a redução do hemo  $c$  através da entrada de um novo electrão, do doador [11, 16].

Alternativamente, a segunda via mecanística (2), na qual ocorre primeiramente a oxidação do hemo  $c$ , por transferência electrónica para o hemo  $d_1$ , o qual é re-reduzido  $[(c^{3+})d_1^{2+}-NO]$  e, seguidamente dá-se a re-redução do hemo  $c$  pela entrada de um electrão, permitindo a quebra da ligação  $d_1-NO$  e a libertação do produto da reacção, o NO, voltando, assim, a proteína ao seu estado totalmente reduzida e pronta para um novo ciclo catalítico [16]. Propõe-se que a via mecanística (2) ocorre preferencialmente em situações em que o meio reacional se encontra rico em NO [1].

Por conseguinte, o papel das proteínas que promovem a redução do cit.  $cd_1$  e, consequentemente, a sua activação, é fundamental para a realização do ciclo catalítico, quer este ocorra através das vias (1) ou (2) propostas no mecanismo reaccional descrito no esquema da Figura 1.8 [11, 13, 16].



## 1.4 TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA INTERMOLECULAR

A transferência electrónica que ocorre entre os dois grupos hémicos (intramolecular) está associada a uma segunda, a qual ocorre entre o hemo *c* do cit. *cd*<sub>1</sub> e um doador electrónico (intermolecular) [2].

*In vivo*, a proteína possui o seu doador electrónico denominado por parceiro redox, encontrando-se referenciado na literatura a utilização de mediadores redox (compostos químicos artificiais) que desempenham o papel de doadores de electrões eficientemente [1].

Os mecanismos de transferência electrónica intermolecular não estão totalmente descritos para esta proteína. Sabe-se que para a enzima se encontrar na sua forma activa necessita de estar reduzida, sendo esse o papel do parceiro redox (conversão de  $[(c^{3+})d_1^{3+}]$  a  $[(c^{2+})d_1^{2+}]$ ), pelo que a utilização de técnicas que avaliam a transferência electrónica se mostram essenciais para a caracterização desta parte do mecanismo enzimático [2].

A electroquímica é uma das técnicas por excelência para a realização desse tipo de estudos. O processo electroquímico propriamente dito corresponde a uma transferência de electrões heterogénea entre a espécie electroactiva e o eléctrodo, tratando-se assim de um mecanismo electroquímico do tipo *E*. Contudo, se ocorrer uma reacção química associada à transferência electrónica heterogénea, trata-se de um mecanismo do tipo *EC* (electroquímico e químico). Este último pode, ainda, ser diferenciado em reversível, caso mantenha o equilíbrio de Nernst, e em irreversível, no caso da reacção directa ser dominante (mecanismo *EC'*) [35]. É, pois, com base neste tipo de mecanismo electroquímico que irá ser estudada a enzima cit. *cd*<sub>1</sub> NiR.

Em termos electroquímicos, define-se uma reacção por transferência electrónica mediada quando esta não ocorrer espontaneamente no eléctrodo mas sim com auxílio de uma proteína/elemento químico, ao invés de directa. Em bioelectroquímica, electroquímica mediada é um processo segundo o qual existe a promoção da transferência electrónica entre o eléctrodo e a proteína por acção de um parceiro/mediador redox, sendo este último o responsável pela transferência de electrões para a enzima.

As técnicas de electroquímica permitem, assim, detectar a transferência electrónica ocorridas de e para os grupos redox das proteínas, como são os casos dos grupos hémicos. Na Figura 1.9 apresenta-se um esquema reacional típico para proteínas da classe das redutases de nitrito. Esta reacção ocorre à superfície de um eléctrodo, o qual fornecerá e receberá, posteriormente, os electrões que são transferidos no sistema por acção do doador electrónico, podendo assim registar o fluxo dos mesmos [2].

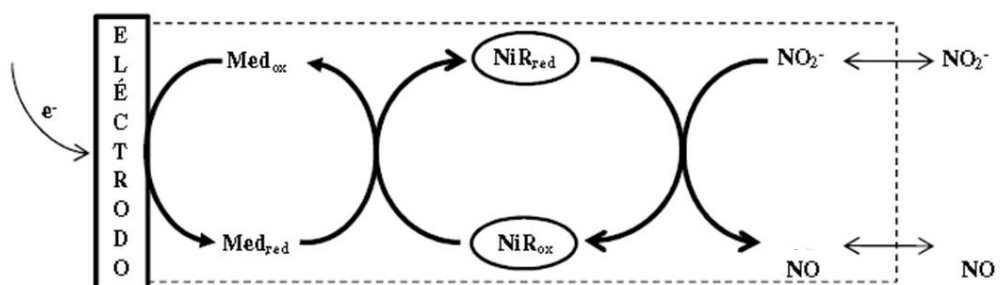


Figura 1.9- Representação esquemática de uma electroquímica mediada à superfície de um eléctrodo para proteínas da classe das redutases de nitrito. Adaptado de [12].

Pormenorizando, a análise da reacção ocorrida à superfície do eléctrodo, para a proteína cit.  $cd_1$  NiR, de *M. hydrocarbonoclasticus*, com o seu respectivo parceiro redox, o cit.  $c_{552}$ , apresenta-se a Figura 1.10. Ambas a proteínas encontram-se imobilizadas na superfície do eléctrodo através de uma matriz de imobilização [12].

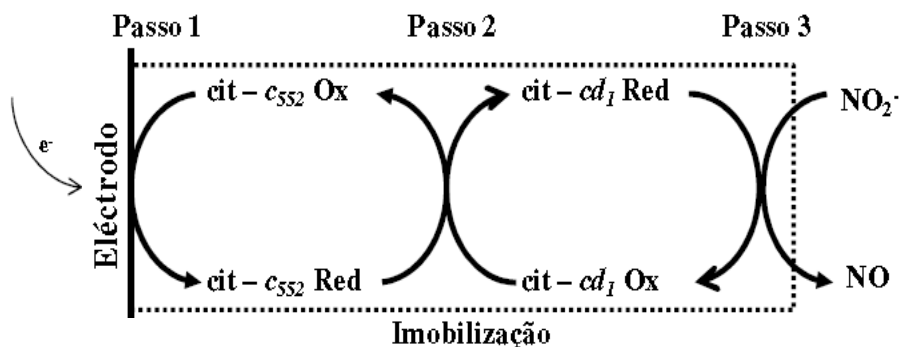


Figura 1.10- Representação esquemática da reacção de catálise ocorrida à superfície do eléctrodo por electroquímica mediada. A proteína trata-se do cit.  $cd_1$  NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*, o parceiro redox é o cit.  $c_{552}$ , estando estes imobilizados na superfície do eléctrodo, o substrato reacional permeia a matriz de imobilização, do meio reacional até à proteína, assim como o produto o faz no sentido oposto. Adaptado de [7, 21]

O mecanismo da Figura 1.10 pode ser dividido em 3 passos diferentes. O passo 1 é denominado de transferência electrónica heterogénea; neste passo ocorre a transferência de um electrão por parte do eléctrodo para o cit.  $c_{552}$ , alterando assim o estado de oxidação deste, de oxidado para reduzido [2]; esta é uma reacção reversível [17, 30].

No passo 2, o cit.  $c_{552}$ -reduzido transfere, por sua vez, um electrão por monómero de cit.  $cd_1$ , que altera assim o seu estado de oxidação (para reduzido), atingindo a sua forma activa. Este processo trata-se de uma reacção química homogénea e é irreversível [17, 30].

O passo 3, e último do esquema reacional, corresponde a uma reacção química homogénea e consiste na conversão do substrato ( $NO_2^-$ ) a produto final (NO). Esta última etapa envolve vários mecanismos de transferência intramolecular (ver secção 1.3.) e trata-se de uma reacção rápida [13, 16].

Como forma de determinar a constante de velocidade associada à reacção que ocorre no passo 2, é necessário que a velocidade desta seja descrita por uma equação de pseudo-primeira ordem [13, 16, 30]. Tal implica garantir que a concentração da enzima seja superior à do cit.  $c_{552}$ ; no entanto não necessita de ser uma concentração física, pois através da reacção do passo 3, com  $NO_2^-$  saturante assegura-se que há uma renovação permanente de cit.  $cd_1$  [34] e, uma vez que o passo 3 é rápido, afirma-se que a enzima está sempre em concentração superior ao parceiro redox. Desta forma, sabe-se que a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k'$ ) é dada pela equação 4:

$$k' = k [\text{cit. } cd_1\text{-ox}] \quad (\text{Equação 4})$$

sendo  $k$  a constante de velocidade de segunda ordem e dependente da concentração da enzima [17, 30].

Para determinar o valor de  $k'$  da reacção é necessário estabelecer uma razão ( $\lambda = I_{\text{cat}}/I_p$ ) entre a corrente catalítica ( $I_{\text{cat}}$ ) e a corrente de transferência heterogénea de controlo ( $I_p$ ) em função do inverso da velocidade de varrimento ( $1/v$ ), segundo a equação 5 [18],

$$\lambda = k' * \frac{RT}{nF} * 1/v \quad (\text{equação 5})$$

em que  $R$  é a constante dos gases,  $T$  a temperatura,  $n$  o número de electrões trocados e  $F$  a constante de *Faraday*. Na reacção desta enzima, a constante de segunda ordem ( $k$ ) é referente à transferência eletrónica intermolecular. Conclui-se, assim, que a constante de transferência intermolecular é dada pelo valor da constante de segunda ordem ( $k$ ).

## 1.5 OBJECTIVOS PROPOSTOS

O trabalho experimental que conduziu à elaboração desta tese teve como objectivo fundamental o estudo estrutural e reaccional da enzima cit.  $cd_1$  NiR da bactéria desnitrificante marinha, *M. hydrocarbonoclasticus*. Para tal, propôs-se a utilização de uma série de técnicas de caracterização e de análise de proteínas, complementares entre si.

O primeiro ponto proposto foi a purificação de duas proteínas provenientes de *M. hydrocarbonoclasticus*, o citocromo  $cd_1$  NiR e o seu parceiro redox fisiológico, o citocromo  $c_{552}$ , em condições de aerobiose e de anaerobiose.

A resposta catalítica da enzima foi estudada por voltametria cíclica, permitindo a determinação de parâmetros cinéticos,  $I_{máx}$  e  $K_{mt}$  e análise da interacção do cit.  $cd_1$  com os vários parceiros redox, cit.  $c_{552}$  e cit.  $c$  de coração de cavalo, avaliando-se, assim, a especificidade da mesma.

Propôs-se, através de métodos electroquímicos, determinar as constantes de velocidade de transferência electrónica intermolecular entre a enzima cit.  $cd_1$  NiR e diferentes doadores electrónicos: i) fisiológico – cit.  $c_{552}$ ; ii) biológico e não fisiológico – cit.  $c$ , e iii) químicos – PMS, índigo carmine e fenosafranina. Mediante os resultados obtidos pretendeu-se caracterizar a influência dos mesmos na actividade catalítica enzimática.

Através de ferramentas computacionais de modelação de estruturas e de *dockings*, pretendeu-se caracterizar as interacções estabelecidas entre os pares enzima/doador electrónico, em termos energéticos e estruturais. Como forma de melhorar os resultados obtidos, em colaboração com a Universidade de Freiburg, na Alemanha, tentou-se determinar a estrutura cristalina da proteína cit.  $cd_1$  NiR, através da técnica de cristalização e difracção por raios X.

## Capítulo 2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

---

Na realização deste trabalho experimental foi utilizado material corrente de laboratório, assim como outros equipamentos que, consoante a sua relevância e características, se passam a descrever.

Na pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica da *Denver Instrumental Company*, com limite de detecção de 0,1 mg. Para a determinação do pH das soluções utilizou-se um medidor de pH micropH2000, da *Crison*, equipado com um eléctrodo de pH, modelo 5209, da mesma marca.

Para a medição de volumes inferiores a 5 mL, foram utilizadas micropipetas de vários volumes (P10, P20, P200 P1000 e P5000) da *VWR- Ergonomic High Performance*.

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água *MilliQ*,  $18\ \Omega\ \text{cm}^{-1}$  (desionizada) com recurso ao aparelho da marca *Simplicity*, equipado com resinas da *Simpak*. Posteriormente, quando necessário, as soluções aquosas foram filtradas com recurso a uma bomba de vácuo e filtros de papel com um *cut-off* de  $0,45\ \mu\text{m}$ , ambos da *VWR International*.

### 2.1 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – CITOCROMO *CD<sub>1</sub>* E CITOCROMO *C<sub>552</sub>*

#### 2.1.1.1 Materiais e reagentes

A purificação das proteínas cit. *cd<sub>1</sub>* NiR e cit. *c<sub>552</sub>* efetuou-se em aerobiose e em anaerobiose. As separações cromatográficas foram efetuados com recurso a um sistema de HPLC *AKTA Basic*, da *GE Biosciences*, acoplado a um computador e controlado pelo programa *Unicorn 5.11* da *GE Healthcare*. Utilizaram-se várias colunas cromatográficas, todas elas de 26 mm de diâmetro e de comprimentos diferentes. As resinas utilizadas possuíam dois tipos de propriedades: i) troca aniónica – *DE- 52*, proveniente da *Whatman*, *DEAE-Fast Flow*, fornecida pela *GE Healthcare*, *Source-15Q*, da *Amersham Biosciences* e *Hitrap*, da *GE Healthcare*; e ii) resinas de exclusão molecular – *Superdex-200* e *Superdex 75*, adquiridas à *GE Healthcare*.

Na preparação dos tampões foram utilizadas como soluções *stock*: 1 M de Tris-HCl (a pH 7,6, para a purificação aeróbia; e pH 8,0, para a purificação anaeróbia) feita a partir do Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base;  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ; 121,14 g/mol; pureza de 99,9%) da *Sigma-Aldrich*, o ácido clorídrico (HCl; 36,46 g/mol; pureza de 37%) da *Riedel-de-Haën*; e 2 M NaCl (NaCl; 58,44 g/mol; pureza de 99%), da *Panreac*, para a realização dos gradientes de força iónica.

No caso das soluções utilizadas na purificação em condições anaeróbias, foram todas desoxigenadas através de vários ciclos sucessivos de vácuo/azoto (pureza de 99,9%).

Como agente redutor, foi utilizado o ditonito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ; 174,11 g/mol; pureza de 87%) e como agente oxidante, o ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ; 329.24 g/mol; pureza de 99%), ambos da *Merck*.

#### 2.1.1.2 Métodos bioquímicos

##### Centrifugação e Ultracentrifugação

Os extratos iniciais foram centrifugados e ultra-centrifugados em tubos da *Nalgene*, nos aparelhos da marca *Beckman Coulter*, com os modelos *Avanti J-26 XPI Centrifuge* e *Optica LX80 Ultracentrifuge*, respectivamente. Para a centrifugação das amostras ao longo do processo de purificação foi utilizada uma centrífuga da *Hermle* (modelo *Z32HK*).

##### Concentração e diálise

As proteínas foram concentradas num sistema de pressão com ar comprimido, utilizando unidades de concentração com membranas porosas da *Sartorius stedium*, com um *cut-off* de 5 kDa para o cit. *c<sub>552</sub>* e 30 e 50 kDa para o cit. *cd<sub>1</sub>* NiR. As diálises foram efectuadas em membranas de diálise da *Spectra-por*, cujo *cut-off* era de 3,5 kDa.

##### Electroforese SDS-PAGE

As electroforeses em condições desnaturantes (*SDS-PAGE*) foram corridas em géis de 12,5% em poliacrilamida, preparados a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida (*Merck*), na presença de 1% dodecil-sulfato de sódio (SDS;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ ; 288,4 g/mol; pureza 99%). Os marcadores de pesos moleculares eram da marca *Fermentas*. Como equipamento, foi utilizado um sistema Mini-Protean da *BioRad* (8 x 7 x 0,75 cm) e uma fonte de tensão da *Electrophoresis power supply*. Os ensaios decorreram durante 1h, a 150 V e a 400 mA.

No final da separação, os géis de poliacrilamida foram corados com azul brilhante de *Coomassie* (*Merck*). Já a coloração para hemoglobina foi feita com recurso a 0.03% TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, *Sigma-Aldrich*), preparado em 30% metanol (v/v, *Panreac*) e 70% tampão acetato pH 5 (v/v, *Panreac*), durante 30 minutos; seguido de uma encubação, durante 10 minutos com peróxido de hidrogénio (*Sigma-Aldrich*); a partir do protocolo de Goodhew *et al.* [36], efectuando a electroforese em condições nativas, isto é, na ausência de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol.

### Quantificação de proteínas

Na quantificação de proteína foram utilizados dois métodos espectrofotométricos: o método de *Bradford* e o método do ácido bicinconínico (*BCA*). Para o primeiro foi utilizado o reagente de Bradford (*BioRad*) e para o segundo o *kit* comercial da *Sigma-Aldrich*. O padrão de proteína utilizado nos dois métodos foi a BSA (do inglês, Bovine Serum Albumin; albumina de soro bovina) da *Sigma-Aldrich*, com uma concentração de 2 mg/ml.

### Espectroscopia de UV/Visível

Para obtenção dos espectros de UV/Visível, assim como para a quantificação de proteína, recorreu-se a um espectrofotómetro do modelo *UV-1800*, da *Shimadzu*; as leituras das amostras foram feitas em células de quartzo, no primeiro caso e em células de plástico (da *Sarstedt*) para o segundo caso, ambas com um percurso óptico de 1 cm.

#### *2.1.1.3 Procedimentos experimentais – purificação citocromo $cd_1$*

### Condições aeróbias

Todas as etapas do processo de purificação em condições de aerobiose encontram-se esquematizadas na Figura 2.1.

A proteína cit.  $cd_1$  NiR foi purificada a partir de células de *M. hydrocarbonoclasticus*, as quais foram crescidas num reator de 300 L na *Unité de Fermentation do LCB-CNRS*, em Marselha, França, sendo o conteúdo periplasmático libertado através da técnica de esferoplastos [37]: as células foram diluídas em água a uma temperatura aproximada de 4 °C numa proporção de 1:5 (volume de células/volume de água), juntamente com 500 µM de EDTA (etilenodiaminatetraacetado de sódio), incubando sob agitação lenta durante 30 minutos. O extrato resultante foi centrifugado durante 30 minutos, a 6 000 rpm e a 4 °C, permitindo assim o isolamento do extrato solúvel e a rejeição do sedimento. No passo seguinte efectuou-se uma ultracentrifugação a 44 000 rpm, durante 70 minutos, a 4 °C, separando-se novamente o sedimento do sobrenadante; este último foi dialisado, durante 15 horas, numa solução de 10 mM Tris-HCl a pH 7,6.

Todo o sistema de purificação, em particular as colunas cromatográficas, foi controlado termicamente por um sistema de recirculação de água, em que a temperatura foi mantida a 4 °C.

De seguida, o extracto solúvel foi aplicado numa coluna de troca aniónica, *DE- 52*, previamente equilibrada com 10 mM Tris-HCl, pH 7,6. A eluição desta coluna decorreu por acção

da gravidade, daí o caudal não permanecer constante, variando entre 6 e 8 ml/min. A primeira proteína a ser eluída foi o cit.  $c_{552}$ , juntamente com o tampão de carga/lavagem, pelo que a sua purificação decorreu separadamente após esta coluna. Depois da eluição total do cit.  $c_{552}$  e da lavagem da coluna, iniciou-se o gradiente de NaCl (0 – 600 mM) em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, sendo o cit.  $cd_1$  NiR eluído com uma concentração salina aproximada de 450 mM de NaCl. Esta fracção de proteína foi novamente dialisada, durante 15 horas, numa solução de 10 mM Tris-HCl, pH 7,6.

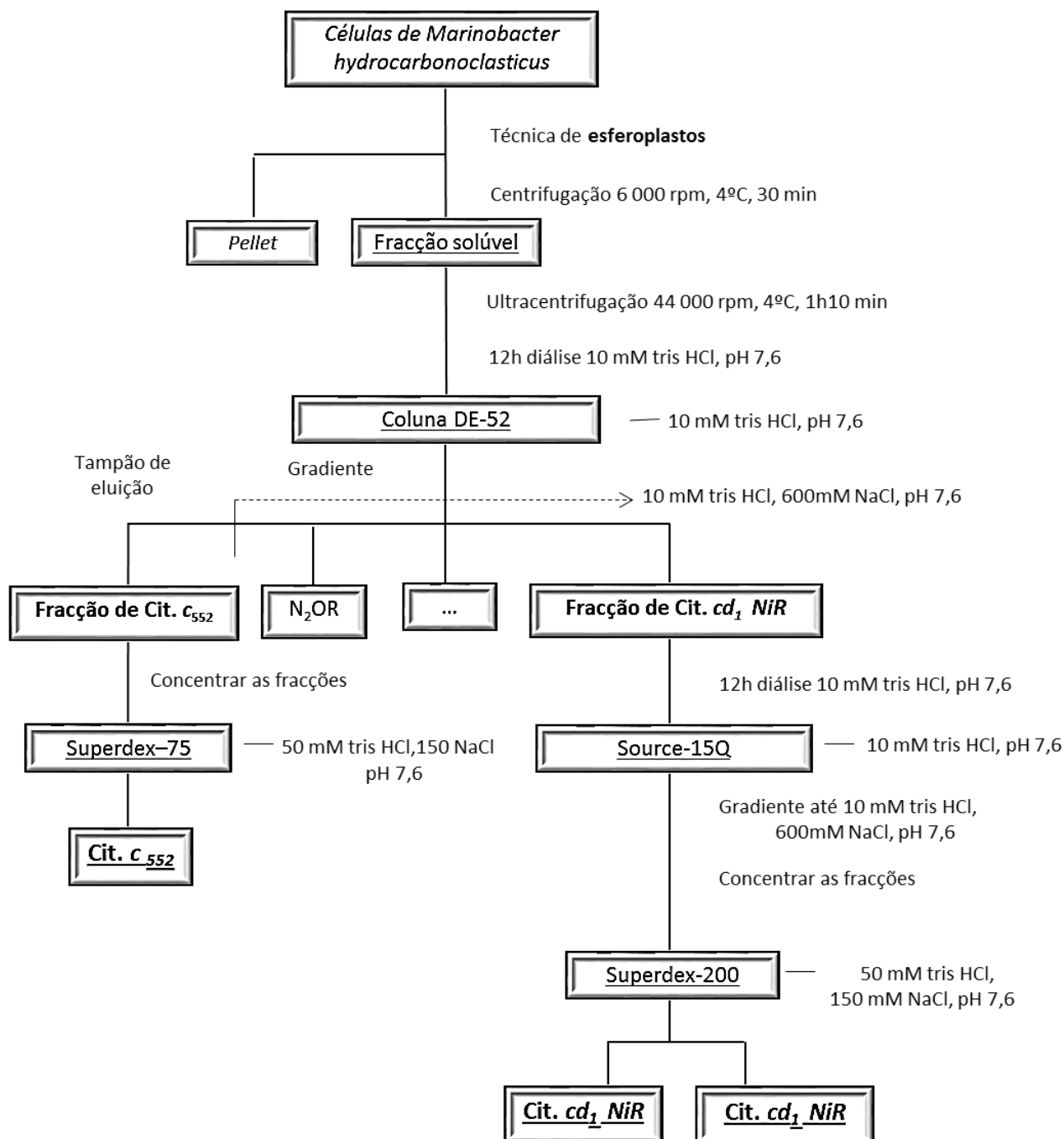


Figura 2.1- Esquema de purificação das proteínas cit.  $cd_1$  NiR e cit.  $c_{552}$  de *M. hydrocarbonoclasticus* em condições aeróbias.



A purificação do cit. *cd<sub>1</sub>* prosseguiu através de uma nova cromatografia de troca aniónica, esta mais selectiva, usando uma coluna *Source-15Q*, equilibrada em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6. A eluição da proteína nesta coluna ocorreu com um caudal constante de 2,5 ml/min, iniciando-se a recolha da fracção quando o gradiente atingia 450 mM de NaCl. A concentração salina variou de 0 – 600 mM em NaCl, sendo o tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,6. A fracção de proteína foi, depois, concentrada com as unidades de concentração cujo *cut-off* era de 30 kDa.

Por fim, a última etapa cromatográfica consistiu numa coluna de exclusão molecular, *Superdex- 200*, equilibrada com 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, a um caudal constante de 2,0 ml/min.

Estes dois últimos processos cromatográficos foram controlados pelo detector de UV/Visível, aos comprimentos de onda de 280, 410 e a 636 nm, acoplado ao sistema de *HPLC*.

Finalmente, a selecção das fracções finais foi feita tendo em conta as razões de pureza calculadas pelas razões das absorvâncias aos comprimentos de onda de 410 e 280 nm ( $Abs_{410\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ ) e as contaminações (se existentes) presentes nas amostras foram determinadas por observação do gel de *SDS-PAGE*, sendo depois guardadas a -80 °C.

### **Condições anaeróbias**

Na purificação em condições de anaerobiose, as células de *M. hydrocarbonoclasticus* foram lisadas através da técnica de esferoplastos [37], com uma ligeira alteração ao protocolo original, ou seja, a diluição das células foi feita em tampão 10 mM Tris-HCl a pH 8,0 (ao *invés* de água), juntamente com 500 µM de EDTA, incubando sob agitação lenta durante 30 minutos. Todo o processo de purificação das proteínas decorreu em condições anaeróbias e o pH dos tampões foi sempre ajustado para 8,0. O esquema de purificação encontra-se apresentado na Figura 2.2.

O extrato resultante foi centrifugado a 50 000 xg durante 30 minutos, com a temperatura controlada a 4 °C, sendo depois separado o extrato solúvel do sedimento, descartando-se este último.

O extrato solúvel foi aplicado numa coluna de troca aniónica, uma *DEAE fast flow*, a qual foi previamente equilibrada com 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, decorrendo o processo a um caudal constante de 3,0 ml/min. A primeira proteína a ser eluída, tal como na condição de aerobiose, foi o cit. *c<sub>552</sub>*, antes do início do gradiente; aquando da realização deste (0 – 600 mM NaCl, em

10 mM Tris-HCl, pH 8,0), o cit. *cd*<sub>1</sub> eluiu a uma concentração aproximada de 450 mM NaCl. A amostra colectada foi posteriormente diluída para minimizar o efeito da concentração salina.

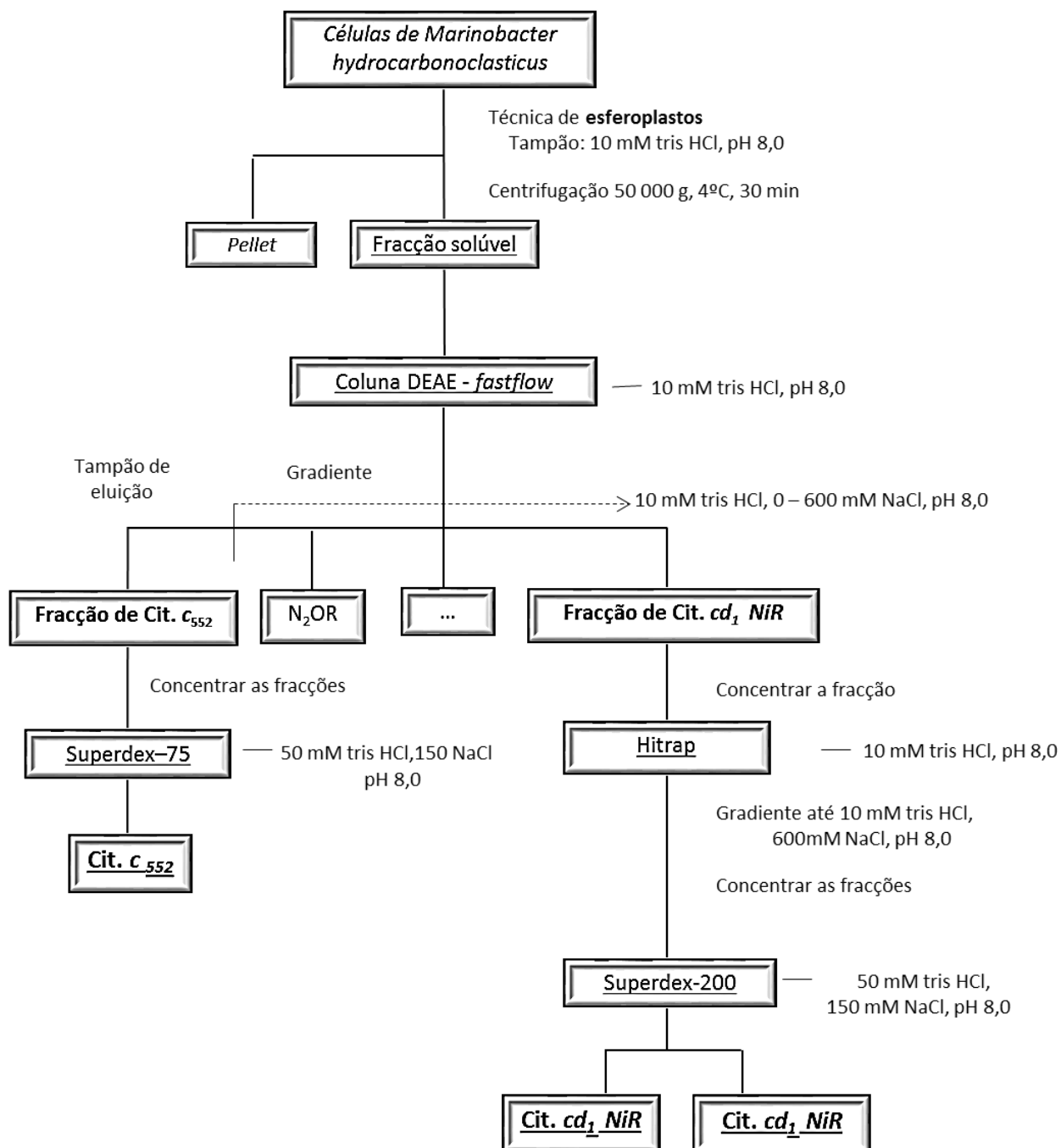


Figura 2.2- Esquema de purificação em condições de anaerobiose das proteínas cit. *cd*<sub>1</sub> NiR e cit. *c*<sub>552</sub> de *M. hydrocarbonoclasticus*.

O passo seguinte foi uma nova coluna de troca aniónica, uma *Hitrap*, equilibrada com 20 mM Tris-HCl, a pH 8,0. O gradiente feito com o mesmo tampão variou-se a concentração de 0 – 600 mM NaCl, sendo a proteína eluída a 400 mM NaCl. A eluição da proteína decorreu a um

caudal de 2,0 ml/min e a fracção colectada foi posteriormente concentrada com unidades de concentração, em condições de anaerobiose, com recurso a pressão, numa membrana com *cut off* de 50 kDa.

O último passo cromatográfico foi uma coluna de exclusão molecular, *Superdex-200*, equilibrada com 50 mM Tris-HCl, 150 NaCl e eluído o cit. *cd<sub>1</sub> NiR* a um caudal constante de 2,0 ml/min.

Todos os perfis cromatográficos foram e registados pelo detector de UV/Visível acoplado ao sistema de *HPLC*, a um único cdo (280 nm). As fracções finais foram separadas aplicando os mesmos critérios descrito na subsecção anterior.

#### 2.1.1.4 Procedimentos experimentais – purificação citocromo *c<sub>552</sub>*

A proteína cit. *c<sub>552</sub>*, tal como o cit. *cd<sub>1</sub> NiR*, é expressa nas células de *M. hydrocarbonoclasticus*. Assim sendo, inicialmente, a purificação desta decorreu de igual modo ao descrito na secção 2.1.1.3 para a proteína cit. *cd<sub>1</sub> NiR*, até à eluição do cit. *c<sub>552</sub>*, que ocorreu após a primeira coluna cromatográfica (*DE-52*, na condição de aerobiose; *DEAE-fast flow*, na condição de anaerobiose), antes da iniciação do gradiente salino. A purificação do cit. *c<sub>552</sub>* decorreu em iguais condições nas duas metodologias. Após a primeira coluna, foi purificada em condições de aerobiose.

Seguidamente, a amostra eluída foi concentrada em unidades de concentração com membrana porosa, cujo *cut-off* era de 5 kDa.

A purificação desta proteína apenas necessitou de mais uma etapa, a cromatografia de exclusão molecular, numa coluna *Superdex-75*, com um tampão de 50 mM Tris-HCl, 150 NaCl, a um caudal constante de 2,0 ml/min. A eluição desta proteína foi controlada pelo detector de UV/Visível a um comprimento de onda de 280 nm, acoplado ao sistema de *HPLC*. A fracção final resultante da proteína foi concentrada em unidades de concentração com membrana de *cut off* de 5 kDa e guardada a -80 °C.

## 2.2 MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

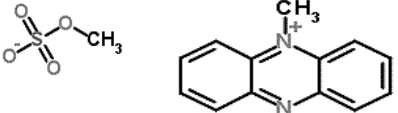
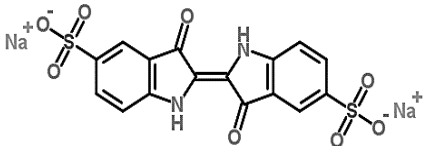
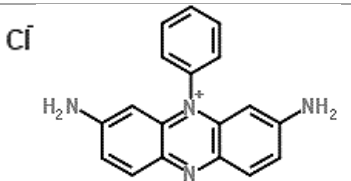
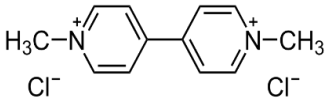
### 2.2.1.1 Reagentes

Foi utilizado como electrólito suporte a solução tamponizada de 50 mM MES (4- morfolimeetanosulfonato de sódio;  $C_6H_{12}NNaO_4S$ ; 217,22 g/mol, pureza >99%; *Sigma Aldrich*), a pH 6,5 e a pH 6,3, em 100 mM de cloreto de potássio (KCl; 74,56g/mol; pureza de 99,5%; *Merck*) e conservados a 4 °C.

No estudo da actividade catalítica da proteína, foram utilizadas soluções *stock* de nitrito de sódio da *Merck* ( $NaNO_2$ ; 68,98 g/mol; pureza de 99%), nas seguintes concentrações: 1, 10, 100 mM e 1 M. Devido ao equilíbrio entre as espécies  $NO_2^-$  e NO que decorre a pH ácido, estas soluções foram sendo renovadas todos os meses e preparadas a pH ligeiramente básico.

Na avaliação da resposta catalítica da proteína foram utilizados compostos químicos como mediadores redox. Estes foram utilizados a partir de soluções *stock* de 1mM. Os compostos utilizados foram: i) PMS, ii) índigo carmine, iii) fenosafranina e iv) paraquat (também conhecido por viologénio de metilo) todos da *Sigma Aldrich* e com uma pureza > 98,5%.

Tabela 2.1- Mediadores químicos de transferência electrónica utilizados no estudo electroquímico do cit. *cd*<sub>1</sub>.

Mediador redox	Massa molecular Fórmula química	Estrutura	E°' (mV) NHE
<b><u>PMS</u></b> (Fenazina, 5-metil-, metil sulfato)	306,34 g/mol <b><u>C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S</u></b>		+ 80
<b><u>Índigo carmine</u></b> (Disódio (2E) -3-oxo-2- (3-oxo-5-sulfonato- 1,3-dihidro-2H-indol-2- elideno) -5- indolinosulfonato)	466,36 g/mol <b><u>C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub></u></b>		- 125
<b><u>Fenosafranina</u></b> (cloreto de 3,7- diamino-5- fenilfenasina-5-ium)	322,79 g/mol <b><u>C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub></u></b>		- 255
<b><u>Paraquat</u></b> (dicloreto de 1,1- dimetil-4, 4-bipiridinio)	257,16 g/mol <b><u>C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub></u></b>		- 440

### 2.2.1.2 Preparação dos eléctrodos

#### Limpeza

Antes da utilização dos **eléctrodos de trabalho**, estes foram sujeitos a um rigoroso processo de limpeza. Primeiramente, o eléctrodo foi polido vigorosamente numa camurça húmida com alumina de diferente granulometrias (0,3 µm e 1 µm) da *Buehtler*. Posteriormente, procedeu-se a uma lavagem com água desionizada, de modo a remover qualquer resíduo de alumina. Numa terceira etapa, o eléctrodo foi levado a um banho de ultra-sons (Brandson 1510), durante cerca de 5 minutos. Finalmente, os eléctrodos foram lavados com etanol diluído em água, numa proporção de 1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH):3 (H<sub>2</sub>O), e abundantemente com água desionizada, sendo secos com ar comprimido.

Os **eléctrodos auxiliar e de referência** foram apenas lavados abundantemente com água desionizada e secos com ar comprimido, no final de cada utilização.

#### Eléctrodo de trabalho - Montagem da membrana de diálise

i) **Pequenas proteínas de transferência electrónica como parceiros redox:** na avaliação da actividade catalítica da enzima *cit. cd<sub>1</sub> NiR* recorreu-se à montagem de uma membrana de diálise (*Spectra-por: cut-off 3500*) na superfície de um eléctrodo de grafite pirolítica. Sobre um pedaço de membrana suportado num pequeno *o-ring*, colocou-se uma gota de 6 µl da seguinte mistura de proteína com os dois parceiros redox: *cit. c<sub>552</sub>* e o *cit. c* de coração de cavalo (utilizaram-se diferentes proporções estequiométricas- 1:1; 1:2; e 1:4). O eléctrodo foi então pressionado contra *o-ring*, levando ao aprisionamento das duas proteínas.

ii) **Mediadores químicos:** no estudo da resposta catalítica da enzima com recurso a mediadores químicos, foi utilizado um procedimento semelhante ao ocorrido para os parceiros redox de natureza biológica, com a excepção do mediador não ter sido imobilizado na membrana juntamente com a proteína (sendo esta a única imobilizada), ficando antes em solução.

### 2.2.1.3 Voltametria Cíclica

Todos os ensaios electroquímicos foram efectuados numa célula de vidro de um só compartimento, usando o potenciostato PGSTAT 12 da *Autolab (Eco-chimie)*, ligado a um computador e comandado pelo *software NOVA (versão 1.6)*. Os eléctrodos de referência de

Ag/AgCl (198 mV vs NHE) e auxiliar de platina eram da *Radiometer*. Como eléctrodos de trabalho foram utilizados eléctrodos de grafite pirolítica (diâmetro= 4 mm, *home-made*) modificados.

As células electroquímicas foram lavadas com detergente comercial e um escovilhão e, seguidamente, mergulhadas durante 15 horas, numa solução de limpeza de ácido sulfúrico diluído numa proporção de 1 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 3 (H<sub>2</sub>O). Antes dos ensaios, as células foram passadas abundantemente por água desionizada, seguida de etanol diluído [1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>):3 (H<sub>2</sub>O)] e mais água desionizada. Por fim, foram secas com ar comprimido.

Foi utilizado um único electrólito suporte, 50 mM MES, 100 mM KCl, a dois valores de pH diferente: a pH 6,5 nos ensaios da determinação das constantes cinéticas, e a pH 6,3 nos ensaios para a determinação das constantes de velocidade de transferência electrónica intermolecular. Antecedendo cada ensaio electroquímico, o electrólito suporte (20 ml) foi desarejado por borbulhamento com um fluxo constante de árgon (Ar), durante cerca de 20 minutos, de modo a evitar interferências do oxigénio no ensaio.

Na análise da actividade catalítica da proteína, foram adicionados nitritos aos ensaios com recurso a micropipetas, sendo a solução borbulhada entre adições, de forma a se homogeneizar a mesma.

A velocidade de varrimento a que decorreram os ensaios electroquímicos foi constante, a 20 mV/s, salvo nas excepções devidamente referidas. Em situação do estudo realizado a várias velocidades de varrimento estas variaram dentro do intervalo 5 a 200 mV/s.

As janelas de potencial utilizadas variaram consoante os doadores electrónicos analisados. Para os parceiros redox biológicos (cit. *c*<sub>552</sub> e cit. *c*) esta variou entre [0,4; -0,3] V; no caso dos mediadores químicos, foram as seguintes: [0,15; -0,32] V para o PMS; [0; -0,6] V para o índigo carmine; e [0,2; -0,8] V para a fenosafranina.

## 2.3 DOCKINGS

O primeiro passo do estudo das interações estabelecidas entre proteínas e parceiros/mediadores redox foi a obtenção das estruturas tridimensionais dos intervenientes, ou seja, das proteínas nos vários estados de oxidação, bem como dos respectivos parceiros redox, através da base de dados *Protein Data Bank (RCSB- PDB)*. As estruturas químicas dos mediadores químicos foram obtidas através do *Pubchem*.

Uma vez que a estrutura do cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus* não foi ainda determinada experimentalmente, foi necessário proceder ao alinhamento da sua sequência primária no algoritmo *NCBI blast – protein* com o qual foi possível identificar a sequência proteica que maior homologia/semelhança apresentasse e, assim, simular a estrutura tridimensional da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus* com o programa computacional *CPHmodels 3.2*, seguido as instruções padrão disponíveis no seu *site*.

As distribuições de carga à superfície (potencial coulombiano) das proteínas foram obtidas com recurso à ferramenta *Coulombic Surface Coloring* existente no programa computacional *UCSF Chimera 1.6*, assumindo como 4,0 o valor da constante dielétrica. A coloração da superfície foi realizada com recurso ao mesmo programa.

Para o estudo das interações propriamente ditas recorreu-se ao algoritmo *BiGGER (Biomolecular Complex Generation with Global Evaluation and Ranking)* através do qual foram simuladas as interações. Após a selecção das interações mais favoráveis energética e quimicamente, estas foram analisadas mais pormenorizadamente cada uma delas com recurso ao *software PDBePisa*. Os resultados finais foram novamente tratados no programa *UCSF Chimera 1.6* de modo a facilitar a sua interpretação e análise das soluções apresentadas.

Na análise realizada para os mediadores químicos, primeiramente as estruturas químicas foram requeridas na base de dados do *Pubchem*, sendo depois o estudo de interacção estabelecido com a enzima realizado pelo algoritmo *Autodock Vina* (incluído no agregador de software *PyRx 0.9*), do qual foram extraídos e analisados mais pormenorizadamente pelo *software HARLEM-molecular modeling program*.

## 2.4 CRISTALOGRAFIA

### 2.4.1.1 *Materiais e Reagentes*

Para a obtenção de cristais da proteína foi necessário a utilização de placas de 24 e 96 poços para a deposição das gotas de proteína, utilizando a técnica de *sitting drop*. Na observação dos cristais formados foi utilizado um microscópio óptico.

Nos ensaios iniciais de cristalização utilizaram-se os *kits* comerciais: o *Index*, o *Morpheus* e o *Footprint I-IV*. Após estes ensaios, verificou-se que alguns agentes precipitantes se mostraram promissores. Foram feitas soluções de soluções de *stock* desses agentes, nomeadamente, 50% (p/v) de PEG 3350 (*Fluka*); 50% (p/v) PEG 5000 (*Fluka*); tampão 0,5 M MES a diferentes pH (5,8; 6,0; 6,5 e 7,0); e fumarato de sódio ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4$ ; 160,04 g/mol).

### 2.4.1.2 *Procedimentos experimentais*

Para a obtenção de cristais da proteína *cit. cd<sub>1</sub> NiR* foi utilizada a técnica de *sitting drop*, consistindo na deposição de uma gota de proteína (0,6 µl) de *cit. cd<sub>1</sub>* (126 µM), numa cavidade, rodeada pela mistura de agentes precipitantes, formando-se o cristal através de difusão vapor. A proteína foi utilizada na sua forma reduzida (purificada em condições de anaerobiose) e adicionando um agente redutor, ditionito de sódio (concentração stock 1 mM, volume <10%). A concentração de proteína utilizada foi de 15 mg/ml. A formação dos cristais decorreu no interior de uma câmara anaeróbia em que a temperatura de cristalização oscilou entre 25-29 °C.

Primeiramente, foi necessário determinar as condições que se manifestassem mais vantajosas para a formação dos cristais da proteína. Assim, fizeram-se placas de cristalização de 96 poços, com as condições pré-definidas, dos três *initial screens* existentes comercialmente: o *Index*, o *Morpheus* e o *Footprint I-IV*.

Após a realização do procedimento anterior foram, então, optimizadas as condições que se manifestaram como as mais promissoras. Assim, foram feitos vários *fine screens* utilizando apenas duas variáveis das soluções precipitantes por placa (24 poços cada), até serem definidas as condições em que os cristais de proteína se formassem.

A avaliação da qualidade dos cristais foi realizada num sistema de difracção de raios X.



## Capítulo 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* é um microorganismo desnitrificante que cresce em condições de anaerobiose facultativa [8]. As condições de crescimento são determinantes para a expressão de enzimas importantes para o processo de desnitrificação, pelo que deve controlar-se a concentração de oxigénio presente no meio, ao longo de todas as etapas do crescimento bacteriano.

Para se proceder à caracterização estrutural e mecanística da proteína redutase de nitrito citocromo  $cd_1$  de *M. hydrocarbonoclasticus* foi necessário purificar a mesma, assim como o seu putativo parceiro redox fisiológico, o citocromo  $c_{552}$ , recorrendo-se para tal a duas metodologias diferentes, isto é, em condições aeróbias e anaeróbias.

#### 3.1.1 Purificação aeróbia

A purificação em condições aeróbias decorreu seguindo o esquema da Figura 2.1 da secção 2.1.1.3 dos métodos experimentais. A quantidade inicial de células foi de 286 g, sendo estas sujeitas a uma lise suave através da técnica de esferoplastos, como referido anteriormente

O extrato proteico foi aplicado numa coluna de gravidade preenchida com uma resina de permuta aniónica, *DE-52*. Dado o *pI* (ponto isoeléctrico) do citocromo  $c_{552}$  ser 6,8 [30], esta proteína não tem afinidade para a resina, tendo sido eluída no tampão de carga/lavagem. Quanto ao cit.  $cd_1$ , foi eluído a 450 mM NaCl, não tendo sido feito o registo cromatográfico à saída da coluna. A fracção da proteína obtida nesta etapa apresentava contaminantes e o seu espectro de UV/Visível observa-se na Figura 3.1.

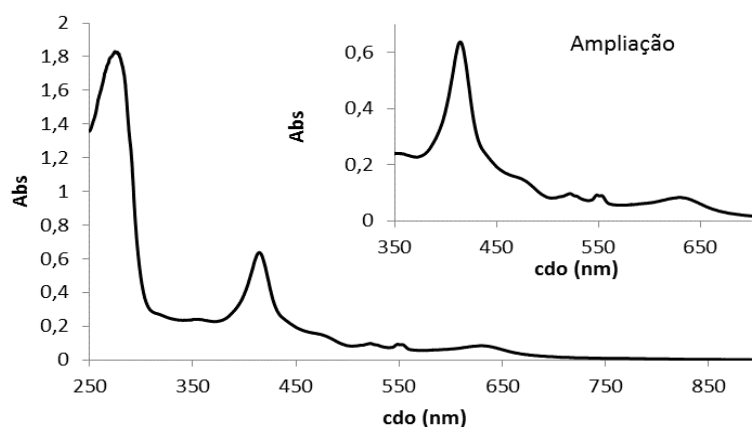


Figura 3.1- Espectro de UV/Visível da fracção de cit.  $cd_1$  NiR após a coluna *DE-52*, cuja razão de pureza é 0,3; inserção de uma ampliação do espectro, na região dos cdo característicos da proteína.

Analisando o espectro de UV/Visível (Figura 3.1) da amostra, verifica-se que se trata da proteína cit. *cd*<sub>1</sub> pois observam-se os máximos de absorção característicos da mesma. Pode afirmar-se que a proteína se apresenta num equilíbrio entre estados oxidado e reduzido, sendo possível observar a banda ao comprimento de onda de 550 nm, o pequeno ombro a 460 nm, ambos característicos da forma reduzida, mas também apresenta o máximo da banda *Soret* a um cdo de 412 nm (forma oxidada). O grau de pureza dado pela razão  $Abs_{5410\text{ nm}}/Abs_{5280\text{ nm}}$ , toma o valor de 0,3.

A coluna seguinte foi uma *Source-15Q*, sendo a proteína eluída após um segundo gradiente salino, em que a concentração de eluição foi novamente de 450 mM de NaCl. O cromatograma foi registado a três cdo: 280, 410 e 630 nm.

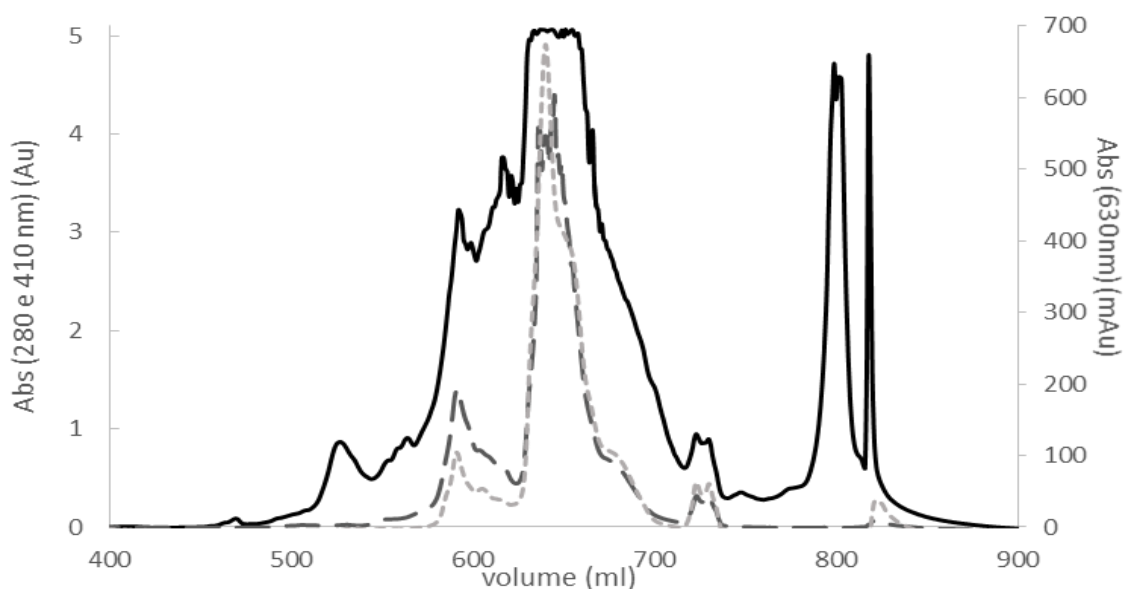


Figura 3.2- Cromatograma da eluição do cit. *cd*<sub>1</sub> da coluna *Source 15Q*, com registo das densidades ópticas a 3 cdo: — 280 nm; --- 410 nm; - - - 630 nm.

Pela observação do cromatograma apresentado na Figura 3.2, é possível verificar que a eluição da proteína ocorreu entre os 620-680 ml de volume eluído, uma vez que nesta posição se verificam os picos máximos para os três comprimentos de onda, sendo estes característicos da proteína. Observa-se também que com esta etapa se removeram contaminantes, uma vez que se observam outras bandas, tanto antes como depois da banda do cit. *cd*<sub>1</sub>.

Nesta etapa foram recolhidas diversas fracções, sendo depois reunidas consoante as suas respectivas razões de pureza (0,6 – 0,8).

A última etapa da purificação foi uma cromatografia de exclusão molecular, numa coluna *Superdex 200*; o cromatograma foi registado a três comprimentos de onda (280, 410 e 630 nm), característicos da proteína.

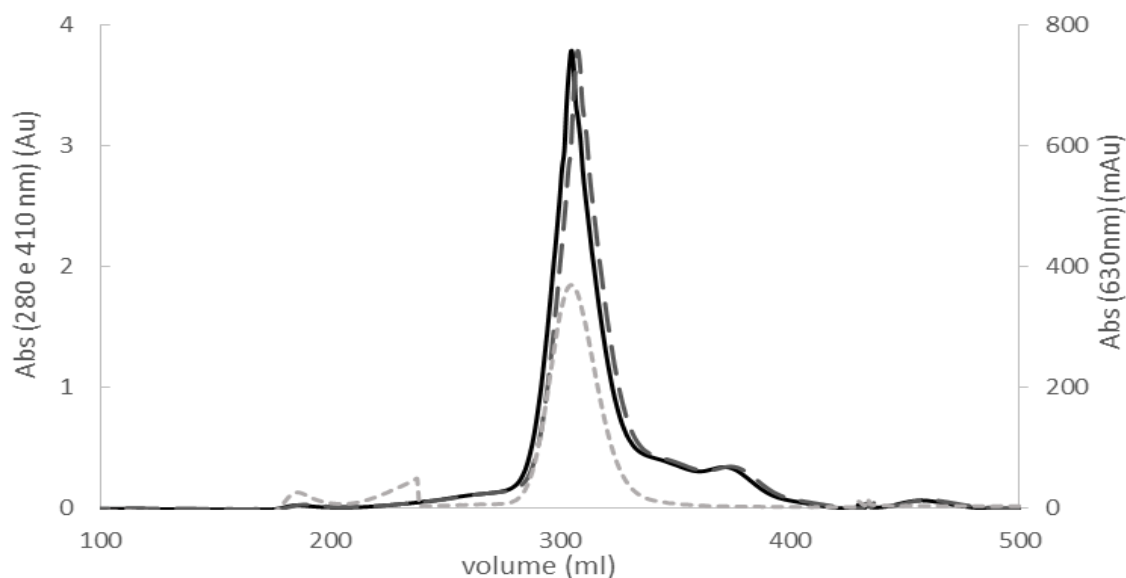


Figura 3.3- Cromatograma da eluição do cit.cd<sub>1</sub> da coluna *Superdex 200*, com registo das densidades ópticas a 3 cdo: — 280 nm; --- 410 nm; - - - 630 nm.

Pela observação do cromatograma apresentado na Figura 3.3, admite-se uma melhoria no grau de pureza da amostra, uma vez que apenas se regista uma banda principal (280-330 ml de eluição). Tendo em conta o registo das absorvâncias aos cdo de 280 e 410 nm (hemo c), verifica-se que as curvas se sobrepõem, e o registo a 630 nm aumenta de intensidade simultaneamente, indicando a presença do hemo d<sub>1</sub>.

Duas das fracções obtidas apresentam razões de pureza elevadas (Rp=1,2 e Rp=1,1), sobretudo quando comparadas com a literatura (Rp=1.05) [28]. Comparando a intensidade dos picos a 411 de 280 nm, verifica-se um elevado grau de pureza da fracção colectada. O espectro UV/Visível (Figura 3.4-A) representa a proteína nos seus dois estados de oxidação, pois é possível observar a presença dos máximos de absorvância do cit. cd<sub>1</sub> NiR, dependentes do seu estado redox.

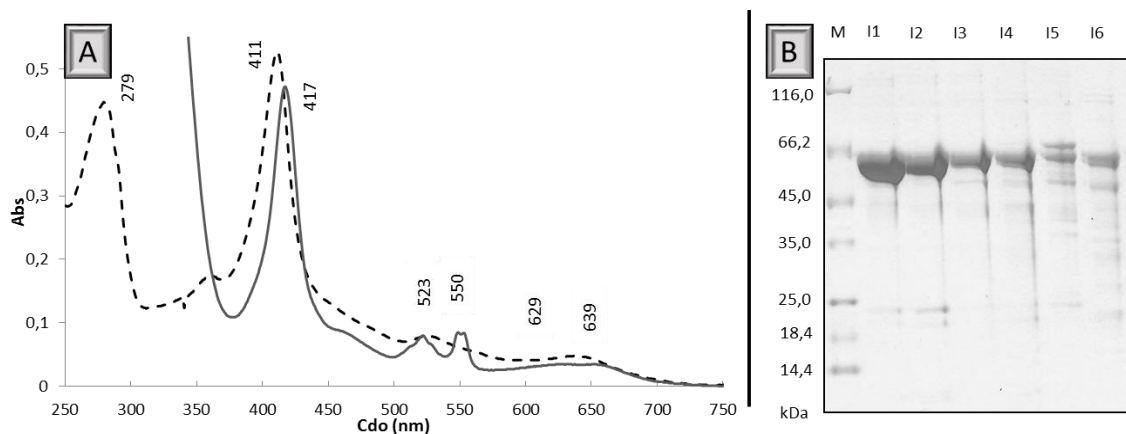


Figura 3.4- Fracções resultantes da purificação de cit. *cd*<sub>1</sub>, após a etapa da exclusão molecular. A – espectro de UV/Visível da fracção mais pura (I<sub>1</sub> do gel *SDS-PAGE*) cuja *R<sub>p</sub>* = 1,2; nos dois estados da oxidação: (---) forma oxidada, (—) forma reduzida; e relevância para os máximos de absorção característicos da proteína; B – gel *SDS-PAGE* das várias fracções purificadas da proteína.

Na Figura 3.4-B é possível comprovar, através do gel *SDS-PAGE*, que as fracções apresentam uma elevada pureza (I<sub>1</sub>-I<sub>2</sub>), uma vez que praticamente se observa apenas uma banda com ≈ 60 kDa (massa do monómero de cit. *cd*<sub>1</sub>).

De modo a avaliar o processo de purificação (remoção de contaminantes), apresentam-se na Figura 3.5, os géis *SDS-PAGE* de fracções representativas em cada etapa cromatográfica, bem como um gel corado para hemoglobina da fracção final.

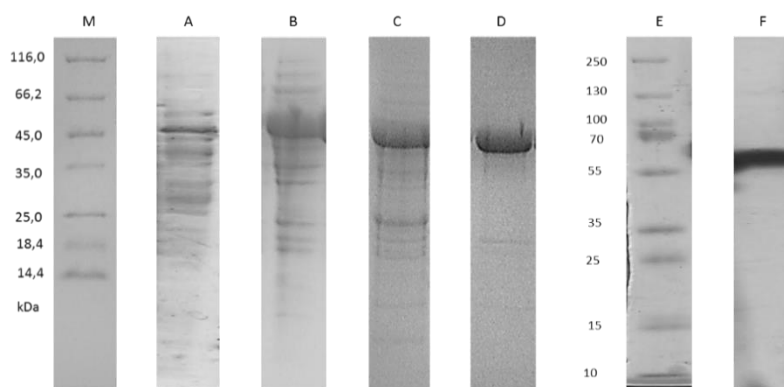


Figura 3.5- Gel *SDS-PAGE* das fracções purificadas em cada etapa cromatográfica e um gel corado para hemoglobina da fracção final. M- marcador de pesos moleculares; A- fracção solúvel; B- fracção após *DE-52*; C- fracção após *Source 15Q*; D- fracção final (após *Superdex 200*); E- marcador de pesos moleculares colorido (hemoglobina); F- fracção final corada para hemoglobina (*R<sub>p</sub>*=1,2).

A soma da quantidade de proteína obtidas nas várias fracções da última etapa cromatográfica permite concluir-se que se obtiveram 0,40 mg de cit. *cd*<sub>1</sub>/g de células, o que se mostrou um valor bastante elevado, quando comparado com valor da literatura (0,05 mg cit. *cd*<sub>1</sub>/g de células [28]).

### 3.1.2 Purificação anaeróbia

A segunda metodologia de purificação decorreu em condições de anaerobiose, uma vez que a proteína possui a capacidade de reagir com o oxigénio molecular, alterando assim o seu estado de oxidação e, possivelmente, modificando a sua conformação estrutural.

O esquema de purificação seguido apresenta-se simplificado na Figura 2.2 na secção 2.1.1.3 dos métodos experimentais. Um passo fundamental foi a preparação de todas as soluções tampão, uma vez que foi necessário proceder ao desarejamento destas, com vários ciclos sucessivos de azoto/vácuo.

Para esta purificação foram utilizados 118 g de células de *M. hydrocarbonoclasticus*. O extrato solúvel foi aplicado numa coluna de permuta iónica, *DEAE fast flow*. Dado o seu ponto isoeléctrico ( $pI=6,8$  [30]), o cit.  $c_{552}$  não aderiu à resina da coluna, sendo logo eluído com o tampão de lavagem. O cit.  $cd_1$  apenas eluiu após o gradiente salino, tal como se observa no cromatograma registado a 280 nm, presente na Figura 3.6.

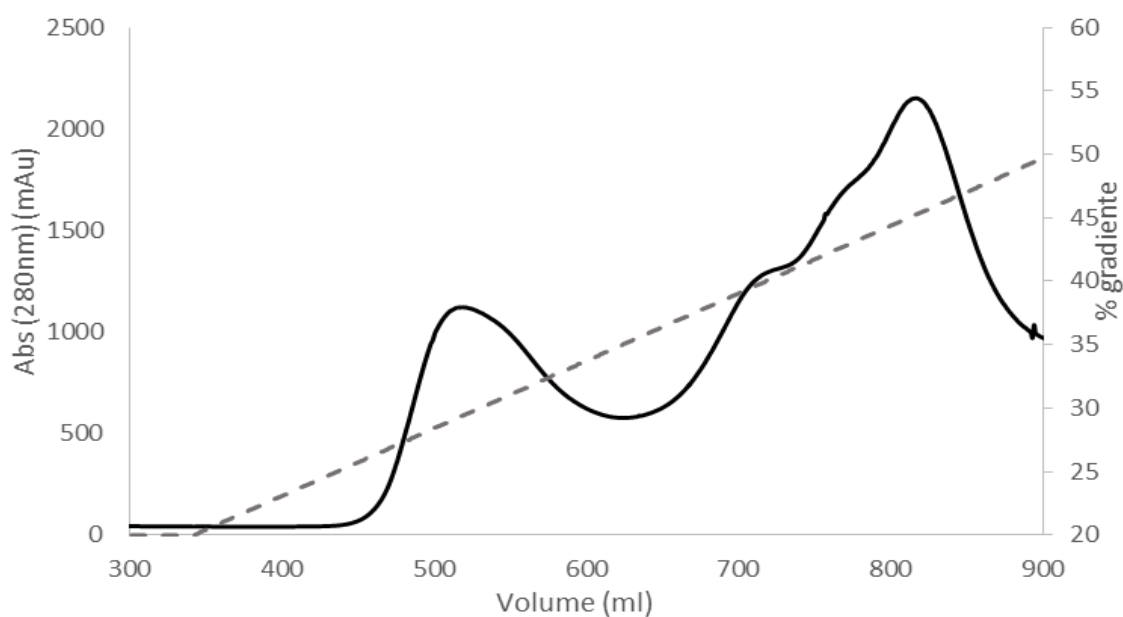


Figura 3.6- Cromatograma da eluição do cit.  $cd_1$  (segunda banda e de maior intensidade) da coluna *DEAE fast flow*, com registo da densidade óptica a 280 nm (\_\_\_\_) e referência ao gradiente salino (\_\_\_\_).

Verifica-se a existência do cit.  $cd_1$ , pela banda registada entre 750-900 ml (segunda do cromatograma, e mais intensa em  $Abs_{280\text{ nm}}$ ), eluiu com uma concentração de 450 mM de NaCl (45% de 1 M NaCl).

Analisando o espectro de UV/Visível da fracção recolhida, presente na Figura 3.7, concluiu-se que esta se refere à proteína cit. *cd<sub>1</sub>*, pois apresenta as bandas características para o estado reduzido da proteína, aos cdo de 460 e 550 nm, assim como o desvio da banda *Soret* para 417 nm.

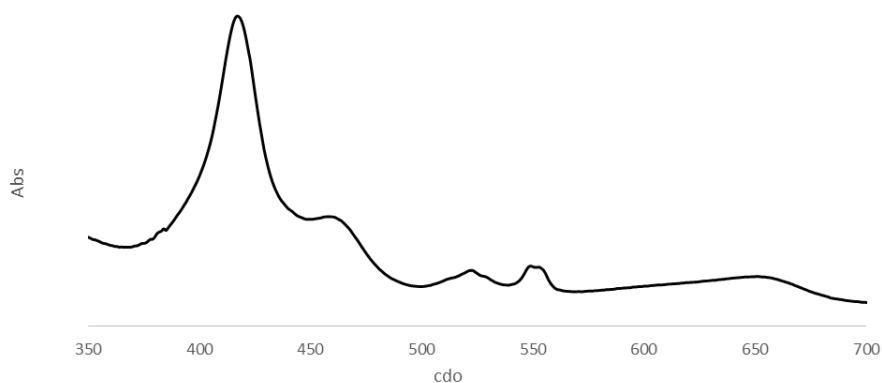


Figura 3.7- Espectro de UV/Visível da fracção de cit. *cd<sub>1</sub>* NiR, após a coluna *DEAE fast flow*.

A etapa seguinte foi uma coluna *Hitrap* (resina de troca aniónica), tendo sido eluídos o cit. *cd<sub>1</sub>* quando a concentração de NaCl era próxima de 400 mM.

O último passo foi uma cromatografia de filtração em gel, numa coluna *Superdex 200*. Os registos cromatográficos das duas últimas etapas são semelhantes aos das colunas *Source 15Q* e *Superdex 200* (ver secção 3.1.1) do presente capítulo. A evolução deste processo de purificação é apresentada, de uma forma sequencial de etapas, nos géis em condições desnaturantes (*SDS-PAGE*) apresentados na Figura 3.8.

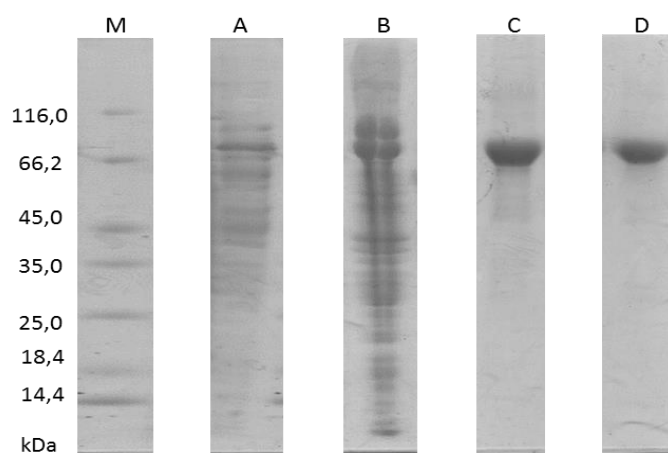


Figura 3.8- Géis *SDS-PAGE* das fracções purificadas em cada etapa cromatográfica. M- marcador de pesos moleculares; A- fracção solúvel; B- fracção após *DEAE- fast flow*; C- fracção após *Hitrap*; D- fracção final (após *Superdex 200*).

Analisando a remoção dos contaminantes presentes na amostra verifica-se que, pela análise electroforética em condições desnaturantes (*SDS-PAGE*), esta purificação se mostrou eficiente ao longo das várias etapas cromatográficas. Em termos de razão de pureza, esta fracção apresenta um valor elevado,  $R_p=1,1$ [28], o que corrobora os resultados apresentados na Figura 3.8.

Para avaliar a eficiência da purificação, procedeu-se à quantificação total de proteína obtida após a última etapa cromatográfica, concluindo-se que, a partir dos 118 g de células de *M. hydrocarbonoclasticus* obtiveram-se 89 mg de proteína purificada, ou seja, 0,75 mg de cit. *cd<sub>1</sub>*/g de células.

### 3.1.3 Purificação citocromo *c<sub>552</sub>*

Como já mencionado, a purificação do cit. *c<sub>552</sub>* ocorreu a partir de células de *M. hydrocarbonoclasticus*, tal como o cit. *cd<sub>1</sub>*, sendo a primeira etapa cromatográfica comum para as duas proteínas, em ambas as metodologias. Seguidamente, a purificação do cit. *c<sub>552</sub>* apenas necessitou de uma cromatografia de exclusão molecular, numa coluna *Superdex-75* (decorrida em iguais condições para ambas as metodologias de purificação apresentadas). Um dos cromatogramas é apresentado na Figura 3.9, no qual se pode verificar a separação de contaminantes, eluindo isoladamente a banda referente ao cit. *c<sub>552</sub>*.

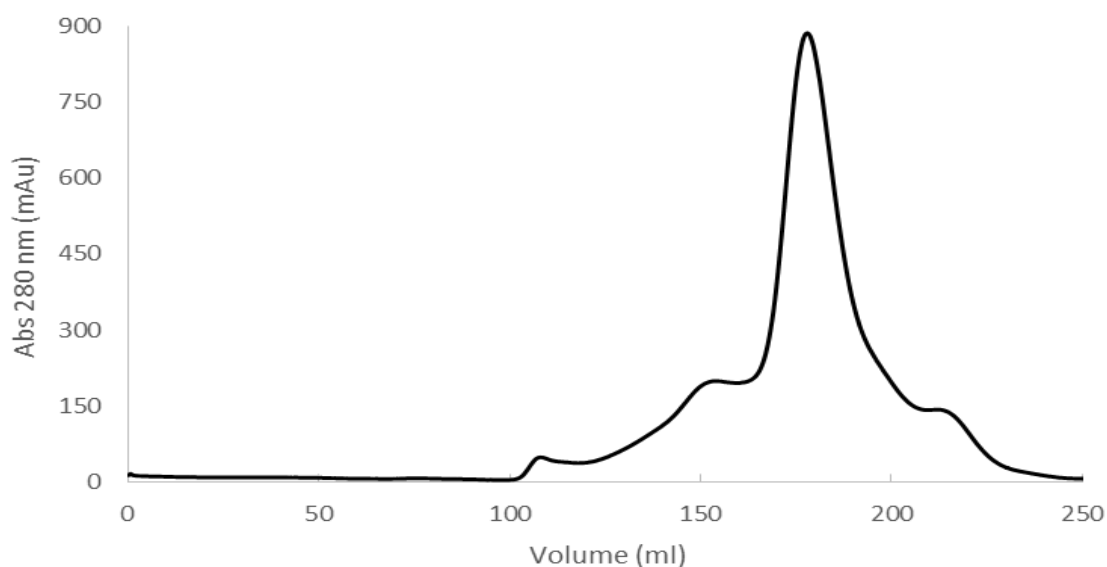


Figura 3.9- Cromatograma da eluição do cit. *c<sub>552</sub>* na coluna *Superdex 75*, com registo das densidades ópticas a 280 nm

Pela observação do cromatograma é possível verificar a existência de uma banda definida entre 160-190 ml referente à fracção colectada do cit.  $c_{552}$ , verificando-se a eluição de contaminantes separadamente.

No final desta purificação do cit.  $c_{552}$  obteve-se a amostra com uma elevada razão de pureza (6,4; da purificação aeróbia), quando comparada com a literatura,  $R_p=6,2$  [31] e uma fracção com  $R_p=5,2$ ; sendo esta proveniente da purificação anaeróbia). Na Figura 3.10 apresentam-se os espectros de UV/Visível de cit.  $c_{552}$  nos dois estados redox da proteína.

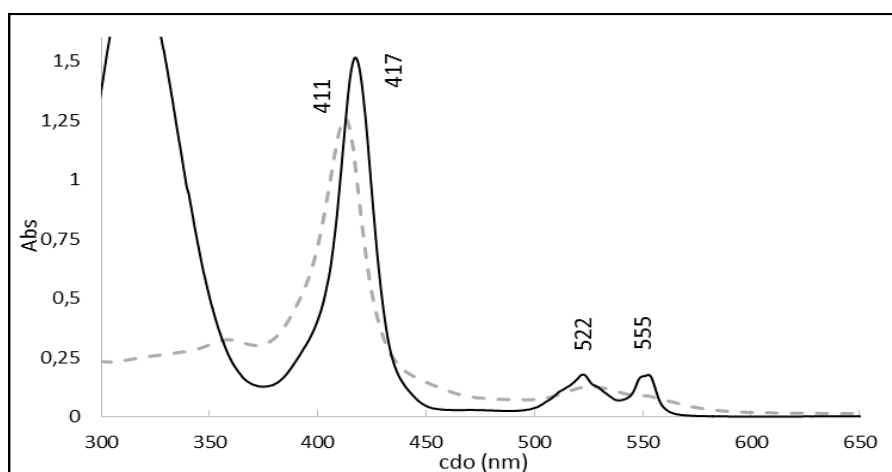


Figura 3.10- Espectro de UV/Visível do cit.  $c_{552}$  nos dois estados da oxidação: (- - -) forma oxidada, (—) forma reduzida; e relevância para os máximos de absorção característicos da proteína.

Pela comparação dos dois espectros apresentados na Figura 3.10, é possível verificar a diferença entre os estados oxidado e reduzido da proteína e comprovar os picos de absorção tal como se apresenta na Tabela 1.2 da secção 1.2.4 da introdução.



### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR

Um método simples de determinação da quantidade de uma proteína, numa amostra praticamente pura e de concentração desconhecida, consiste na utilização de um parâmetro denominado por constante de absorvidade molar ( $\epsilon$ ). Este é característico para cada proteína e específico para um determinado cdo, geralmente nos máximos de absorção característicos, sendo também dependente do estado de oxidação da proteína. A absorvidade molar permite a aplicação da lei de Lambert-Beer:  $A = \epsilon b c$ , em que  $A$  é a absorvância,  $b$  o percurso óptico, e  $c$  a concentração da amostra.

A composição primária da proteína fornece a informação necessária para o cálculo deste parâmetro. Aplicando-se a equação 6, conhecendo a composição em aminoácidos, o número subunidades, e massa molecular [38], pode-se avançar-se para a determinação do  $\epsilon$ .

$$\epsilon(280 \text{ nm}) = n \text{ Trp} \times \epsilon_{280\text{nm}}(\text{Trp}) + n \text{ Tyr} \times \epsilon_{280\text{nm}}(\text{Tyr}) + \text{Cys} \times \epsilon_{280\text{nm}}(\text{Cys}) \quad (\text{Equação 6})$$

Verificando os valores do  $\epsilon$  para o cit.  $cd_1$  de diferentes microrganismos (Tabela 3.1), pode verificar-se que os valores apresentam-se muito próximos entre si.

**Tabela 3.1-** Valores da constante de absorvidade molar para a proteína cit.  $cd_1$  NiR de vários microrganismos, para a forma oxidada da proteína. Ref. [39]

Microrganismo	$\epsilon \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$ monómero <sup>-1</sup>	cdo (nm)
<b><i>P. pantotrophus</i></b>	148	406
	18,5 <sup>§</sup>	641
<b><i>Ps. stutzeri</i></b>	141	411
<b><i>Ps. aeruginosa</i></b>	141*	412

\*Ref. [16]; § Ref. [39]

Para se proceder ao cálculo experimental do valor de  $\epsilon$  utilizou-se uma amostra com elevado grau de pureza ( $R_p=1,2$ ) e determinou-se a sua concentração, obtendo-se os valores médios de  $37,59 \pm 3,26 \text{ } \mu\text{M}$  e  $41,03 \pm 1,78 \text{ } \mu\text{M}$ , por dois métodos. Aplicando a lei de *Lamber-Beer*, determinaram-se os  $\epsilon$  para 3 cdo (280, 409 e 636 nm). Os resultados apresentam-se na Tabela 3.2

Tabela 3.2-Valores do  $\epsilon$  determinado experimentalmente para 3 cdo do monómero da proteína *cit. cd<sub>1</sub>* de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Comprimento de onda (nm)	$\epsilon$ (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) monómero <sup>-1</sup>		
280	112.0	±	5.8
411	116.1	±	5.8
637	10.6	±	0.9

Quando comparados os valores obtidos experimentalmente (Tabela 3.2) com os valores dos vários  $\epsilon$  da literatura (Tabela 3.1), verifica-se que os primeiros são mais baixos. No entanto, como o cálculo deste parâmetro apenas é dependente da composição em aminoácidos e sabendo que a identidade entre as sequências de *M. hydrocarbonoclasticus* e de *Ps. aeruginosa* é 70% e com *P. pantotrophus* é de 63% (ver Tabela 3.5 da secção 3.5.1) [18], logo os restantes aminoácidos terão influência determinante no valor final do parâmetro.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

A velocidade reaccional a que ocorre uma cinética enzimática é dependente da concentração de substrato existem, assim esta pode ser descrita pela equação de Michaelis- Menten,

$$v_0 = \frac{I_{m\acute{a}x}*[S]}{K_m+[S]} \quad (\text{equação 7})$$

em que  $v_0$  é a velocidade da reacção;  $[S]$  a concentração do substrato;  $I_{m\acute{a}x}$  a intensidade máxima a que ocorre a reacção, sendo referente à intensidade de saturação; e  $K_m$  a constante de Michaelis, sendo referente à afinidade entre enzima e substrato.

A determinação experimental dos parâmetros cinéticos  $I_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  foi feita com base em ensaios electroquímicos, nos quais se imobilizou a enzima (cit.  $cd_1$  NiR) conjuntamente dois parceiros redox, um fisiológico, o cit.  $c_{552}$  e outro apenas biológico, o cit.  $c$  de coração de cavalo; ambos electroactivos. Utilizaram-se 3 proporções estequiométricas diferentes (1:1; 1:2 e 1:4), mantendo quantidade de enzima constante, apenas se aumentando a quantidade do parceiro redox, sendo que a velocidade reaccional não deve depender da concentração destes [14, 18].

#### 3.3.1 Citocromo $c_{552}$ – $I_{m\acute{a}x}^{app}$ e $K_m^{app}$

O primeiro doador electrónico, com o qual foi analisada a resposta electroquímica da enzima cit.  $cd_1$ , foi o cit.  $c_{552}$ , parceiro redox fisiológico.

Inicialmente procedeu-se à caracterização da reversibilidade do sistema, sendo analisados os voltamogramas cíclicos (VCs), a várias velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s),<sup>6</sup> referentes à ausência de substrato (dados não apresentados). Para tal verificou-se que: i) a intensidade da corrente é proporcional à velocidade de varrimento; ii)  $E^{0'} \approx +272$  mV vs NHE, ( $E^0$  do cit.  $c_{552}$  +245 mV vs NHE [30]); iii)  $I_{pc}/I_{pa} \approx 1,3$ ; e iv)  $\Delta E \approx 0,120$  V, que como apenas está envolvido um electrão na reacção, este valor deveria ser 0,059 V. Com estes resultados pode-se afirmar que este é um sistema quasi-reversível, sendo controlado por difusão

Os ensaios foram realizados a velocidade de varrimento constante (20 mV/s), fazendo-se adições crescente da concentração de nitrito. Apresentam-se os VCs dos ensaios para cada uma das proporções estequiométricas estudadas.

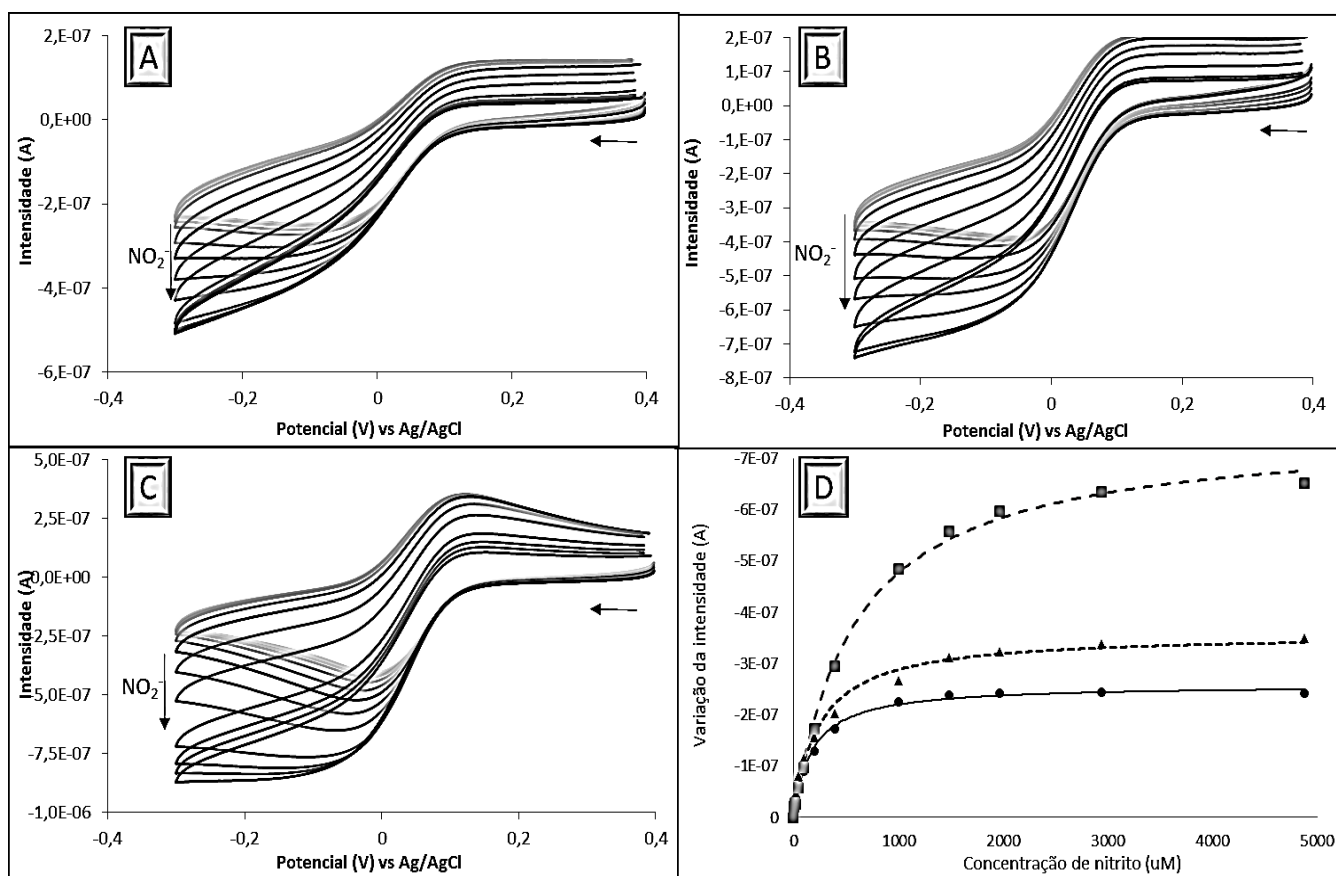


Figura 3.11- Voltamogramas cíclicos da resposta enzimática, com adição de concentrações crescentes de nitrito (0 – 4,9 mM); a velocidade de varrimento constante (20 mV/s); com a proteína *cit. cd<sub>1</sub>* e o parceiro redox fisiológico, *cit. c<sub>552</sub>* imobilizados com membrana, em diferentes proporções estequiométricas (excesso de parceiro redox). A – proporção de 1:1; B – proporção de 1:2; C – proporção de 1:4. D – traçado das curvas de Michaelis-Menten para as várias proporções estequiométricas: \_\_\_\_ proporção 1:1; - - - - proporção 1:2; \_\_\_ proporção 1:4.

Pela observação da Figura 3.11 (A, B e C) é possível verificar que no comportamento dos VCs, com a adição de nitrito, existe uma alteração dos seus aspectos, uma vez que a intensidade do sinal catódico aumenta com a concentração de nitritos, verificando-se assim que o VCs tem um aspecto sigmoidal (característico da actividade catalítica saturada). Este comportamento é repetido para cada uma das proporções estudadas, afirmando-se que se atingiu o ponto de saturação da actividade enzimática.

Os comportamentos catalíticos verificados podem ser descritos segundo uma curva de Michaelis-Menten, sendo esta traçada segundo a equação 5, fazendo-se variar a diferença das intensidades dos sinais catódicos em função da quantidade de nitrito adicionado à solução.

Analisando as curvas de Michaelis-Menten apresentadas na Figura 3.11-D, observam-se as duas regiões que caracterizam este tipo de curvas: i) fase de velocidade crescente com a concentração de substrato; ii) fase de saturação de velocidade da reacção, constante e independente da concentração de nitrito. Observa-se, também que quanto maior a proporção de enzima/parceiro, maior a velocidade a que se atinge a saturação da actividade enzimática.

Determinando os valores das constantes cinéticas,  $I_{\text{máx}}$  e  $K_m$ , e portanto a uma caracterização quantitativa do sistema, obtiveram-se os valores apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Valores das constantes cinéticas experimentais da enzima cit  $cd_1$  NiR, com o cit.  $c_{552}$  como parceiro redox de transferência electrónica.

Proporção estequiométrica	Valor médio $I_{\text{máx}}^{\text{app}}$ (A/s)			Valor médio $K_m^{\text{app}}$ ( $\mu\text{M}$ )		
1:1	$-2,11 \times 10^{-7}$	$\pm$	$3,22 \times 10^{-8}$	173,35	$\pm$	54,03
1:2	$-3,71 \times 10^{-7}$	$\pm$	$9,93 \times 10^{-8}$	263,77	$\pm$	53,01
1:4	$-8,54 \times 10^{-7}$	$\pm$	$8,31 \times 10^{-8}$	542,25	$\pm$	63,32

Analisando os valores destas constantes cinéticas, conclui-se que, quanto maior proporção estequiométrica, maior será os  $I_{\text{máx}}$  e também maior o  $K_m$ , sendo esta relação regida de uma forma linear com o aumento estequiométrico. Assim, com estes resultados verifica-se que os valores da velocidade da reacção são dependentes da concentração da enzima, pelo que as constantes são nomeadas de aparentes, portanto determinaram-se o  $I_{\text{máx}}^{\text{app}}$  e o  $K_m^{\text{app}}$ .

### 3.3.2 Citocromo c – $I_{\text{máx}}^{\text{app}}$ e $K_m^{\text{app}}$

O segundo doador electrónico estudado foi o citocromo c de coração de cavalo, apesar de ser um doador de electrões biológico, este não é o parceiro fisiológico do cit.  $cd_1$  NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Primeiramente, procedeu-se à caracterização da reversibilidade do sistema, verificando-se que: i) a intensidade da corrente dos picos catódicos e anódicos são directamente proporcionais à velocidade de varrimento; ii)  $E^{0'} \approx +263$  mV,  $E^0$  do cit. c é +279 mV vs NHE [30]; iii)  $\Delta E \approx 0,09$  V, que como apenas está envolvido um electrão na reacção, este valor deveria ser 0,059 V; iv)  $I_{\text{pc}}/I_{\text{pa}} \approx 1,0$ . Com os resultados observados pode-se afirmar que o sistema se apresenta como *quasi*-reversível.

Tal como no estudo anterior, realizado com o cit. *c<sub>552</sub>*, também para este parceiro redox se realizaram ensaios electroquímicos variando a proporção estequiométrica enzima/doador electrónico, adicionando nitrito em concentrações crescentes, para avaliar a resposta catalítica da enzima e extrair os parâmetros cinéticos.

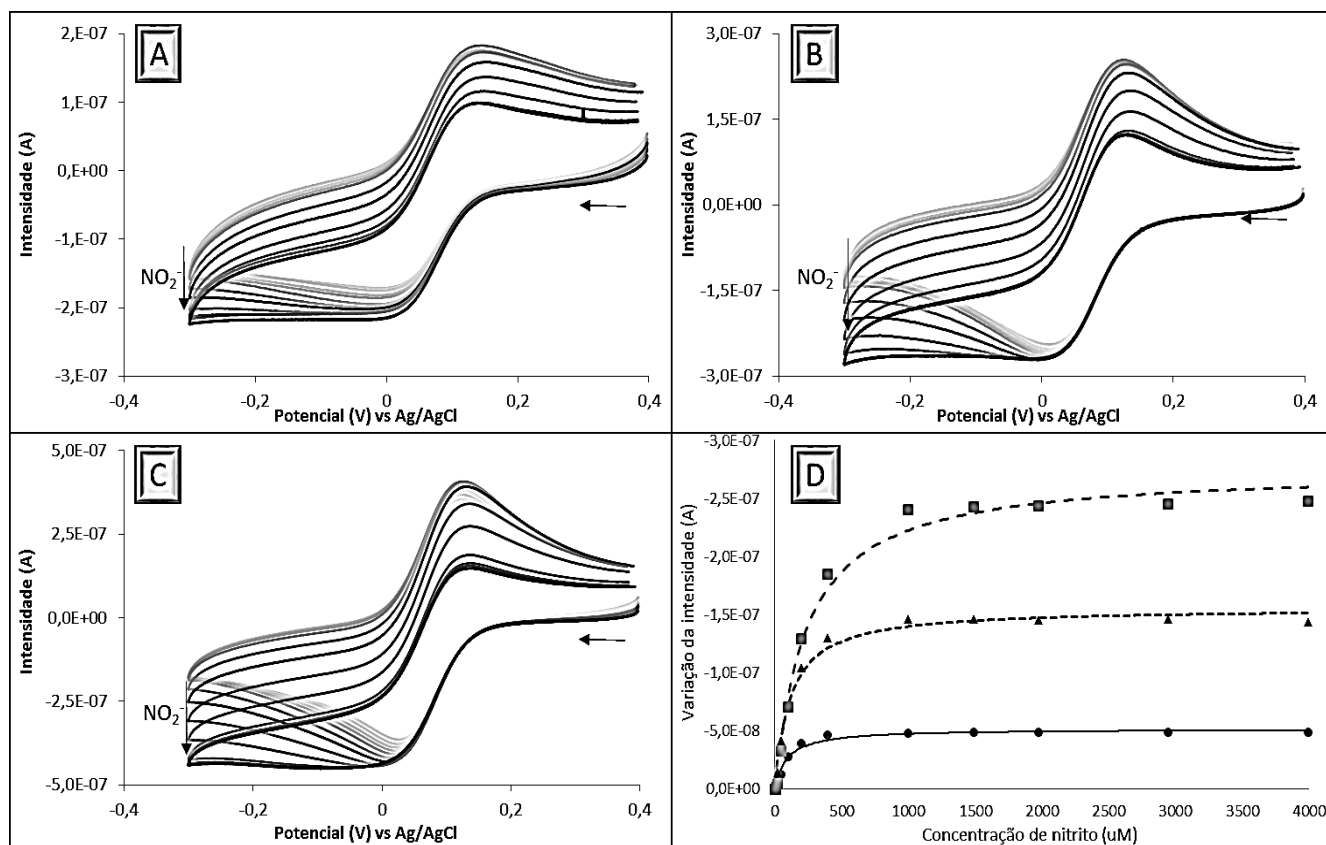


Figura 3.12- Voltamogramas cíclicos da resposta enzimática, com adição de concentrações crescentes de nitrito (0 – 4,0 mM); a velocidade de varrimento constante (20 mV/s); com a proteína *cit. cd<sub>1</sub>* e o parceiro redox biológico, *cit. c*, de coração se cavalo imobilizados com membrana, em diferentes proporções estequiométricas (excesso de parceiro redox). A – proporção de 1:1; B – proporção de 1:2; C – proporção de 1:4. D – esboço das curvas de Michaelis- Menten para as várias proporções estequiométricas: \_\_\_\_ proporção 1:1; - - - - proporção 1:2; \_ \_ \_ \_ proporção 1:4.

Os primeiros resultados apresentados representam os VCs dos ensaios realizados (Figura 3.12-A, B e C). Analisando a resposta electroquímica à adição de nitrito, verifica-se que os VCs apresentam um aumento da intensidade dos picos até que, quando a concentração de substrato se torna muito elevada, a enzima atinge a saturação da sua actividade enzimática. A resposta catalítica da enzima é expressa pelo comportamento dos VCs de aspecto sigmoidal, podendo este ser descrito segundo curvas de Michaelis-Menten.

A relação existente entre a intensidade do pico catódico e a concentração de nitrito adicionado à solução apresenta-se na Figura 3.12-D. Analisando estes resultados, verifica-se que as curvas possuem as características de Michaelis-Menten e que existe uma relação de aumento da velocidade da reacção com o aumento da proporção enzima/parceiro.

Determinaram-se os valores das constantes cinéticas,  $I_{máx}$  e  $K_m$ , e apresentam-se na Tabela 3.4.

*Tabela 3.4-* Valores das constantes cinéticas experimentais da enzima cit  $cd_1$  NiR com o cit.  $c$  de coração de cavalo como parceiro redox de transferência electrónica.

Proporção estequiométrica	Valor médio $I_{máx}^{app}$ (A/s)			Valor médio $K_m^{app}$ ( $\mu$ M)		
1:1	$-6,91 \times 10^{-8}$	$\pm$	$2,20 \times 10^{-8}$	86,15	$\pm$	17,87
1:2	$-1,39 \times 10^{-7}$	$\pm$	$5,45 \times 10^{-8}$	135,50	$\pm$	18,44
1:4	$-2,76 \times 10^{-7}$	$\pm$	$2,75 \times 10^{-8}$	222,60	$\pm$	34,53

Conclui-se que quanto maior a proporção estequiométrica, maior será a velocidade da reacção associada, aumento que acontece de uma forma linear com a proporção estequiométrica, tal como verificou para o cit.  $c_{552}$  (ver secção 3.3.1), logo dependente da concentração de doador de electrões, portanto os parâmetros cinéticos são nomeados de aparentes, assim sendo, determinaram-se o  $I_{máx}^{app}$  e o  $K_m^{app}$ .

A utilização destes valores de proporções estequiométrica teve como referência as quantidades utilizadas em ensaios de biossensores. Com estes resultados é evidente que existe uma dependência dos parâmetros extraídos das curvas de Michaelis-Menten com a concentração dos parceiros redox, pelo que para se proceder à determinação dos parâmetros cinéticos  $I_{máx}$  e  $K_m$  é necessário que a proporção estequiométrica seja superior.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA INTERMOLECULAR

Para a determinação da constante de velocidade de transferência electrónica intermolecular foi utilizada a técnica de electroquímica mediada, baseada no modelo do mecanismo apresentado na Figura 1.10 da secção 1.4. Garantido que, através das condições experimentais a reacção enzimática segue um comportamento de pseudo-primeira ordem. Assim, a partir da equação 5 e fazendo variar  $\lambda$  em função  $1/v$ , foi possível determinar o valor da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem e substituindo na equação 4, determinou-se a constante de velocidade de segunda ordem, ou seja, a constante de velocidade de transferência electrónica intermolecular.

Com este estudo procurou avaliar-se a especificidade entre a enzima cit.  $cd_1$  NiR e os potenciais parceiros redox, nomeadamente: o citocromo  $c_{552}$ , extraído do mesmo microrganismo, o qual poderá desencadear possíveis alterações estruturais enzimáticas, necessárias à sua funcionalização. Para efeitos comparativos, optou-se por estudar igualmente a resposta electroquímica do cit.  $cd_1$  com o citocromo  $c$  de coração de cavalo, que é uma proteína transportadora de electrões versátil, na medida em que é capaz de transferir electrões para enzimas de vários microrganismos.

#### 3.4.1 Citocromo $c_{552}$ – Parceiro fisiológico putativo

A análise seguinte consistiu na caracterização da resposta electroquímica do cit.  $c_{552}$ , ou seja, da transferência electrónica heterogénea desta proteína, sendo o ensaio realizado na ausência de nitrito (Figura 3.13-A) e a diferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s). Verifica-se: i) o  $E^0 \approx +256,7 \pm 14,8$  mV vs NHE, sendo aproximado do  $E^0$  do mediador (+245 mV vs NHE [16, 30]); ii)  $I_{pc}/I_{pa} \approx 0,9$  sendo próximo de 1; iii) a intensidade da corrente é proporcional à velocidade de varrimento; e iv)  $\Delta E \approx 0,091$  V, que como apenas está envolvido um electrão na reacção, este valor deveria ser 0,059 V. Uma vez que os critérios de reversibilidade não são verificados na sua totalidade, apenas se pode afirmar que se trata de um sistema quasi- reversível, dado o afastamento da reversibilidade não ser muito pronunciado.

Prosseguiu-se com o estudo para a determinação da constante de velocidade de transferência intermolecular.



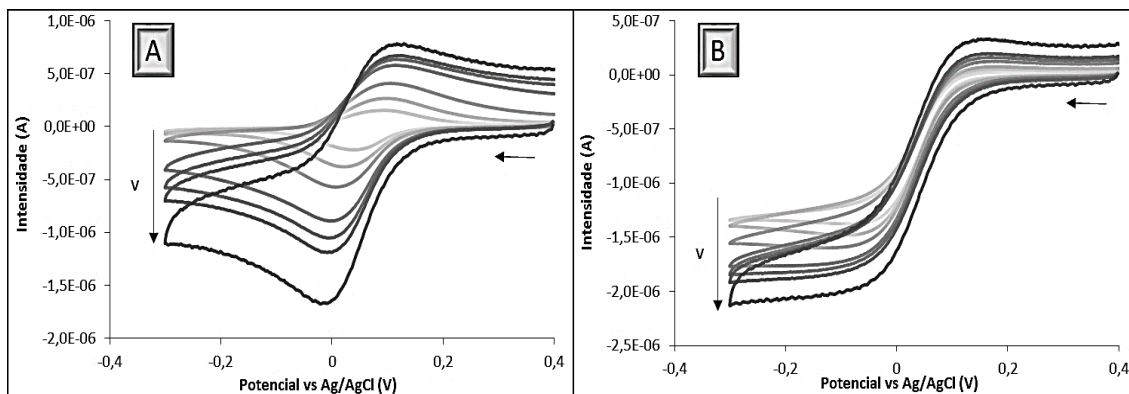


Figura 3.13- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a diferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s) com a proteína *cit. cd<sub>1</sub>* e o parceiro redox *cit. c<sub>552</sub>* (70  $\mu$ M) imobilizados com membrana. A – na ausência de nitrito, B – com excesso de nitrito (6 mM).

Procedeu-se à caracterização dos VCs na presença de concentrações saturantes de nitrito (Figura 3.13- B). A partir destes, é possível observar um comportamento característico de catálise enzimática, uma vez que os VCs têm um aspecto sigmoidal. Observa-se que existe uma relação de dependência linear entre a intensidade do sinal e a velocidade de varrimento e, quando comparada a intensidade relativa dos picos catódicos (não catalítico e catalítico) verifica-se um aumento linear com a velocidade de varrimento.

A Figura 3.14-A mostra o gráfico de  $\lambda$  (razão entre a intensidade do sinal catalítico e não catalítico) em função de  $1/v$  (inverso da velocidade de varrimento), para várias concentrações de enzima. Avaliando as regressões lineares obtidas a partir dos dados experimentais para as diferentes concentrações de enzima, verifica-se que os declives são dependentes da concentração *cit. cd<sub>1</sub>*, permitindo o traçado de uma nova recta (Figura 3.14-B).

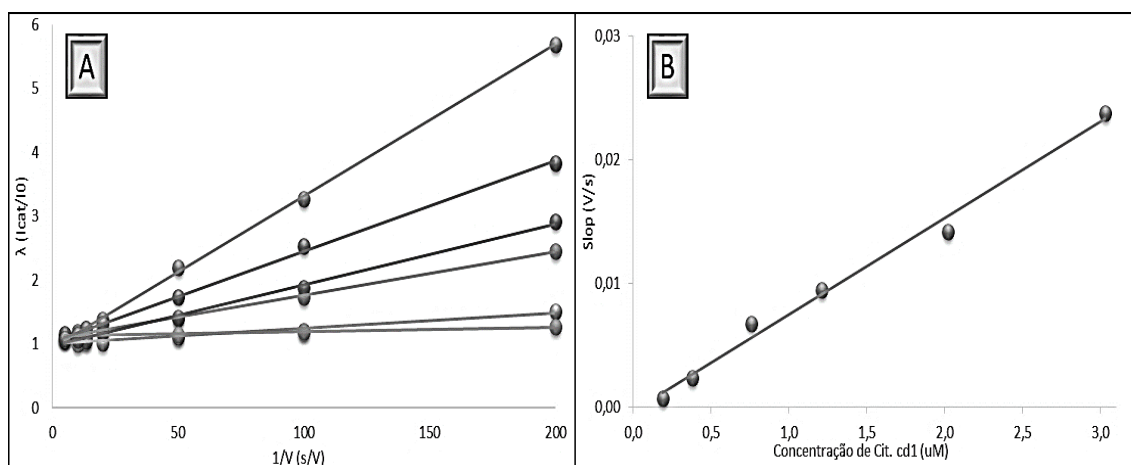


Figura 3.14- Representação da relação de dependência entre a intensidade do sinal com a concentração da proteína *cit. cd<sub>1</sub>*. A –  $\lambda$  ( $I_{cat}/I_0$ ) em função de  $1/v$  para várias concentrações de proteína, B – relação de dependência do declive da recta em função da concentração de proteína *cit. cd<sub>1</sub>*.

A partir desse novo declive e aplicando a equação 4 é possível extrair o valor da constante de velocidade de segunda ordem ( $k$ ), ou seja, a constante de velocidade de transferência electrónica intermolecular. Para este ensaio, esta toma o valor de  $1,32 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . O significado físico deste resultado indica a quantidade de electrões (em unidades de molaridade) que são transferidos a cada segundo, entre as duas proteínas, cit.  $cd_1$  e cit.  $c_{552}$ . Quando comparado com o valor descrito na literatura ( $4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [2]), para o cit.  $cd_1$  do mesmo microrganismo,  $k$  é cerca de 3 vezes inferior. No entanto, os dois ensaios não decorreram em iguais condições, os ensaios referidos neste trabalho foram realizados com membrana, o que se mostra como uma limitação ao sistema; e o trabalho referido na literatura diz respeito a uma electroquímica em solução, utilizando eléctrodos de ouro modificados.

### 3.4.2 Citocromo c de coração de cavalo – Parceiro biológico

O segundo parceiro redox estudado tratou-se do citocromo  $c$  de coração de cavalo.

A electroquímica do cit.  $c$  é normalmente reversível. Os VCs da Figura 3.15-A mostram que o sistema é praticamente reversível, pois cumpre quase completamente os critérios de reversibilidade, nomeadamente: i) a intensidade da corrente dos picos é directamente proporcional à velocidade de varrimento; ii) o  $E^0 \approx +286,7 \pm 3,1 \text{ mV vs NHE}$ , sendo do  $E^0$  do cit.  $c$  ( $+279 \text{ mV vs NHE}$  [16, 30]); iii)  $\Delta E \approx 0,085 \text{ V}$  (apenas está envolvido um electrão na reacção, este valor deveria ser  $0,059 \text{ V}$ ); iv)  $I_{pc}/I_{pa} \approx 1,0$ .

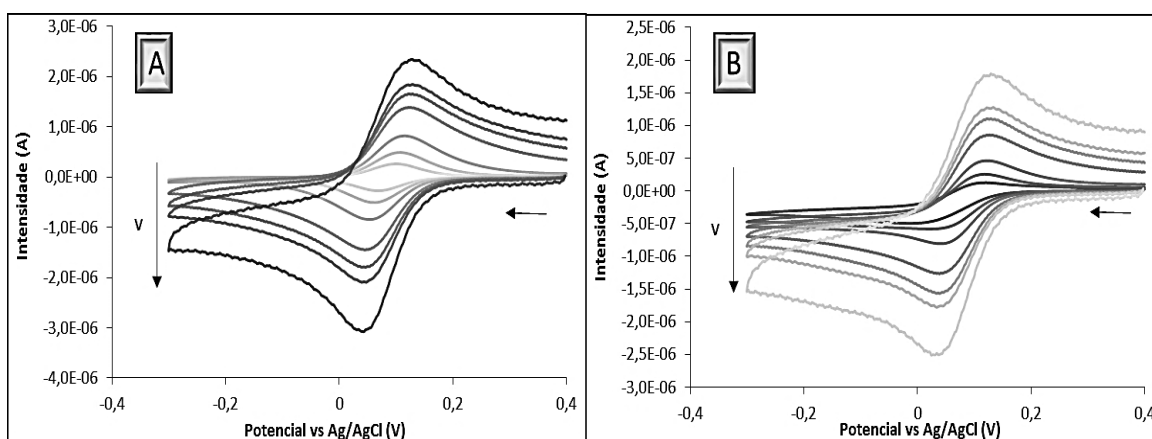


Figura 3.15- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s) com a proteína cit.  $cd_1$  e o parceiro redox cit.  $c$  de coração de cavalo ( $70 \mu\text{M}$ ) imobilizados com membrana. A – na ausência de nitrito, B – com excesso de nitrito ( $6 \text{ mM}$ ).

Pela observação dos VCs da Figura 3.15-B, resultantes dos ensaios realizados em condições de  $[\text{NO}_2^-]$  saturante, observa-se que estes não adquirem um aspecto sigmoidal, característico de uma resposta catalítica. De facto, a razão das intensidades relativas dos picos catalíticos e não catalíticos (para a mesma velocidade de varrimento) não apresentam um aumento significativo, indicando que o processo catalítico é muito mais lento.

Resolveu, então, avaliar-se a resposta electroquímica dos VCs de cada uma das velocidades de varrimento individualmente.

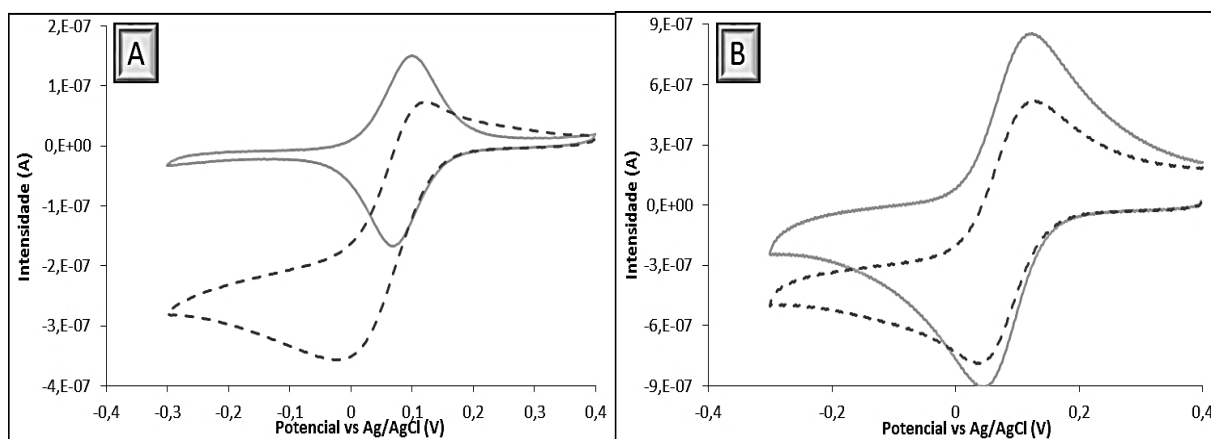


Figura 3.16- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit.  $cd_1$  e o parceiro redox cit.  $c$  de coração de cavalo ( $70 \mu\text{M}$ ) imobilizados com membrana. A – a  $5 \text{ mV/s}$ , B – a  $50 \text{ mV/s}$ ; com os VCs na ausência de nitrito (—), e com saturação de nitrito (---)

Analisando a Figura 3.16, é possível verificar uma diferença significativa no comportamento dos VCs, para as duas velocidades de varrimento apresentadas. Enquanto para os  $5 \text{ mV/s}$  (Figura 3.16-A) observa-se uma resposta de catálise enzimática pelo perfil sigmoidal do VC com concentrações saturantes de substrato, esta catálise tende a desaparecer para velocidades de varrimento mais elevadas, como é apresentado para  $50 \text{ mV/s}$ , na Figura 3.16-B; para velocidades de varrimento mais elevadas não se observa diferença entre os VCs (na presença e ausência de  $\text{NO}_2^-$ ). Uma vez que este mecanismo enzimático se trata do tipo  $EC'$  (mecanismo electroquímico com reação química associada), afirma-se assim que para velocidades de varrimento mais elevadas a transferência electrónica torna-se tão rápida que não permite que ocorra a reacção química que está associada. Assim, para este sistema (cit.  $c$ ) a transferência electrónica apenas é observada para resposta catalítica a velocidades de varrimento mais lentas.

Tendo em conta os resultados apresentados, e visto não se cumprirem os parâmetros necessários (reação química tem de ser rápida) para a determinar a constante velocidade de transferência electrónica intermolecular, este estudo não pode prosseguir.

### 3.4.3 PMS

Passou-se assim para a caracterização da transferência electrónica entre a enzima *cit. cd<sub>1</sub>* e mediadores químicos. O primeiro composto a ser testado como mediador redox foi o PMS, o qual tem um potencial formal de redução de +80 mV vs NHE.

Tal como para os compostos biológicos, também para os mediadores químico se procedeu a uma análise prévia da reversibilidade do sistema. Analisando os VCs na ausência total de substrato, conclui-se que: i) a intensidade da corrente é directamente proporcional à velocidade de varrimento; ii) o  $E^{0'} \approx +81,9 \pm 4,4$  mV vs NHE, sendo aproximado do  $E^0$  do mediador (+80 mV vs NHE); iii)  $I_{pc}/I_{pa} \approx 1,2$ ; e iv)  $\Delta E \approx 0,056$  V, visto estar envolvido apenas um electrão na reacção, este valor deveria ser 0,059 V. Com os resultados obtidos pode-se afirmar que o sistema cumpre os critérios de reversibilidade, à excepção da razão  $I_{pc}/I_{pa}$ , podendo afirmar-se que este sistema tem um comportamento quasi-reversível.

Seguidamente apresentam-se os VCs, na ausência de nitrito e na presença de quantidades saturantes de substrato, fazendo-se variar a concentração de enzima imobilizada e fixando a concentração de mediador electrónico em solução.

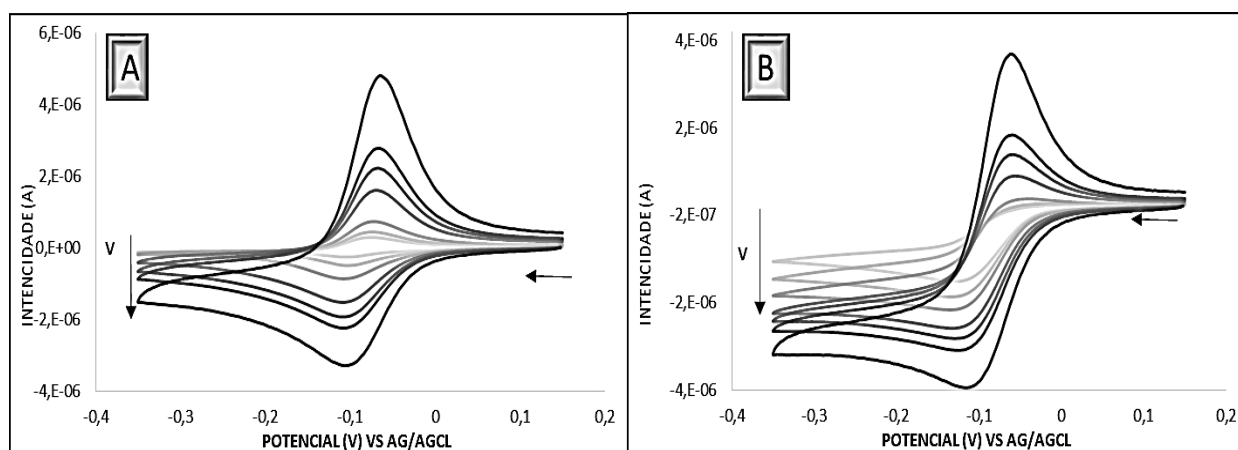


Figura 3.17-Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s) com a proteína *cit. cd<sub>1</sub>* imobilizados com membrana e o mediador redox PMS (70  $\mu$ M) em solução. A – na ausência de nitrito, B – com saturação de nitrito (6 mM).

Na Figura 3.17-A observam-se os VCs referentes à ausência de nitrito, ou seja, a transferência electrónica heterogénea do mediador químico PMS. Com a adição de nitrito em concentração saturante à solução, verifica-se um aumento da intensidade da corrente do pico catódico; contudo no pico anódico deveria de diminuir a sua intensidade, o que não se verificou. Nestas condições não se pode afirmar que os VCs apresentam uma resposta catalítica, tal como se observa na Figura 3.17-B.

Assim sendo, decidiu-se avaliar os VCs, para as várias velocidades de varrimento, individualmente, para se proceder à caracterização da resposta catalítica do sistema. A título de exemplo, apresentam-se os VCs para 5 e 200 mV/s, individualmente.

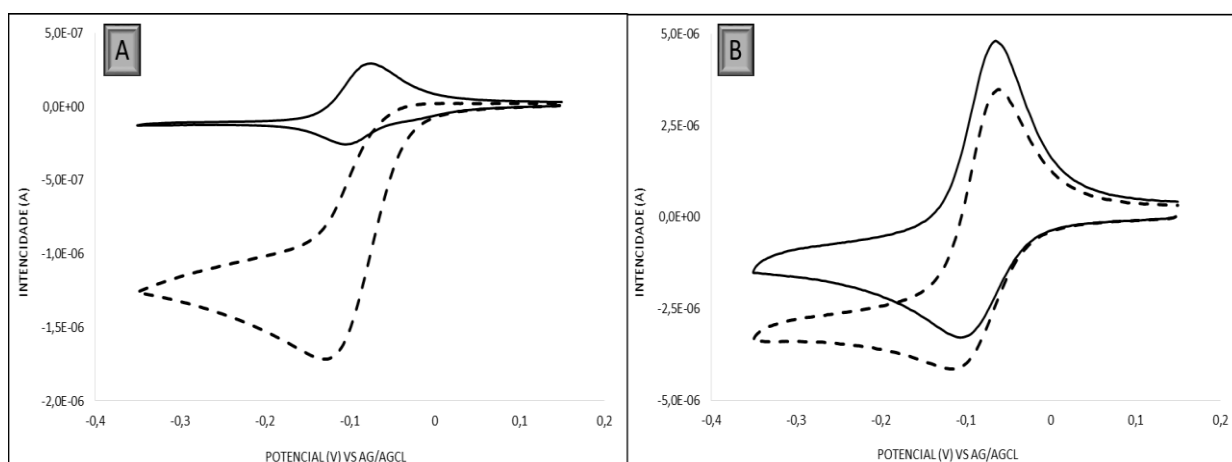


Figura 3.18- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit.  $cd_1$  imobilizada com membrana e o mediador redox PMS (70  $\mu$ M), em solução. A – a 5 mV/s, B – a 200 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (—), e com saturação de nitrito (---)

Analisando a Figura 3.18-A é possível verificar que para velocidades de varrimento mais baixas, 5 mV/s, o VCs apresenta uma resposta da enzima, relativamente à presença de nitrito em solução, isto é, existe uma alteração do perfil do VCs, tornando-se sigmoidal e deixa-se de observar o pico analítico prenunciado. À medida que se aumenta a velocidade de varrimento do ensaio, os VCs adquirem novamente o comportamento semelhante ao verificado para a ausência de nitrito em solução, sendo este facto resultado da ausência da resposta catalítica da enzima. Observando a Figura 3.18-B é possível verificar as semelhanças entre os dois VCs e o aumento da intensidade do pico anódico. Assim sendo, pode afirmar-se que a velocidade de transferência electrónica ocorre mais lenta que a transferência de electrões entre o eléctrodo e o mediador redox, não permitindo que a reacção química associada ocorra eficientemente.

Uma vez que o sistema não cumpre com os critérios necessários para a determinação da constante de transferência electrónica intermolecular, este estudo não pode prosseguir.

### 3.4.4 Índigo carmine

O segundo mediador redox avaliado foi o índigo carmine, que possui um potencial de -125 mV vs NHE.

Avaliando o grau de reversibilidade do sistema, conclui-se que: i) a intensidade da corrente é directamente proporcional à velocidade de varrimento; ii)  $I_{pc}/I_{pa}$  é muito superior a 1, não se observando um pico anódico claramente definido; iii)  $\Delta E \approx 0,079$  V, visto estar envolvido apenas um electrão na reacção, deveria ser 0,059 V; iv) e o  $E^{0'} \approx -117,3 \pm 6,9$  mV vs NHE, sendo aproximado do  $E^0$  do mediador (-125 mV vs NHE). Com estes resultados, verifica-se que apesar dos critérios de reversibilidade não são totalmente cumpridos, afirmar-se que este se trata de um sistema quasi-reversível.

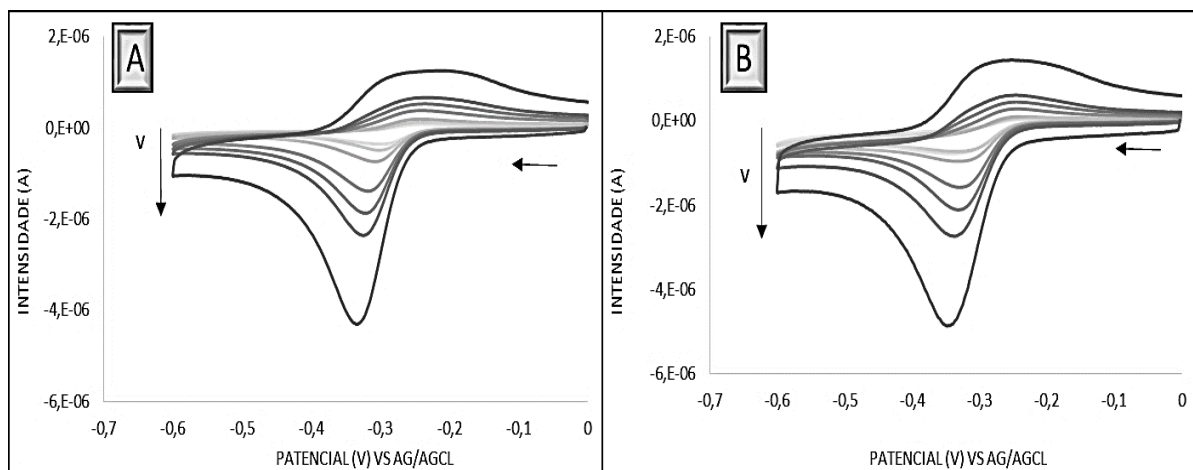


Figura 3.19- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s), com a proteína *cit. cd<sub>1</sub>* imobilizada com membrana e o mediador redox, índigo carmine (70  $\mu$ M), em solução. A – na ausência de nitrito, B – com saturação de nitrito (6 mM).

Na análise dos VCs apresentados na Figura 3.19, verifica-se a existência da dependência entre a intensidade dos picos e a respectiva velocidade de varrimento a que decorreu o ensaio. Observa-se também o aumento da intensidade da corrente, apesar de reduzida, quando se adiciona uma concentração saturante de nitrito. Quanto ao comportamento dos VCs, estes não tomam um aspecto sigmoidal, logo não se pode afirmar que se trata de uma resposta catalítica em condições saturantes de substrato.

Avaliaram-se os VCs, para cada uma das velocidades de varrimento independentemente, de modo a ser possível caracterizar o comportamento corresponde a um mecanismo  $EC'$ . Assim, apresentam-se a título de exemplo, os VCs para 5 e 200 mV/s.

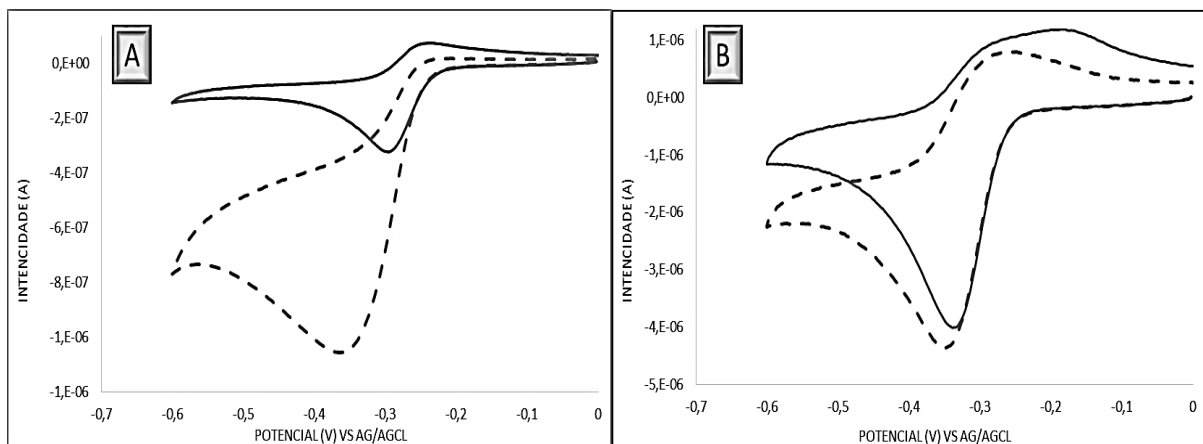


Figura 3.20- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína cit.  $cd_1$  imobilizada com membrana e o mediador redox índigo carmine (70  $\mu$ M), em solução. A – a 5 mV/s, B – a 200 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (—), e com saturação de nitrito (---)

Analisando a Figura 3.20, é possível verificar que, também para este mediador químico, que os VCs para velocidades de varrimento mais baixas apresentam um aspecto sigmoidal, e portanto um comportamento catalítico. Ao analisar-se os VCs para velocidades de varrimento mais elevadas (200 mV/s) não se verifica o carácter catalítico deixando de ser observar o aumento da intensidade do pico catódico com a adição de substrato. Com este resultado, conclui-se que para este sistema não são verificadas as condições para a determinação da constante de velocidade de transferência electrónica entre o mediador químico e a enzima; assim este estudo não pode ser continuado.

### 3.4.5 Fenosafranina

Por fim, o último mediador químico estudado foi a fenosafranina, sendo, dos três compostos químicos utilizados como doadores electrónicos, o que apresenta um potencial mais negativo, - 255 mV vs NHE.

Tal como para os ensaios anteriores, também para a fenosafranina se procedeu a uma caracterização prévia da reversibilidade do sistema. Sabendo que: i) a intensidade da corrente é directamente proporcional à velocidade de varrimento; ii)  $I_{pc}/I_{pa}$  é aproximadamente 1; iii) o  $\Delta E \approx 0,061$  V; iv) e o  $E^{0'} \approx -243,9 \pm 10,6$  mV vs NHE, sendo aproximado do  $E^0$  do mediador (-255 mV vs NHE). Com estes resultados é possível afirmar que se está perante um sistema quasi- reversível.

Seguidamente, apresentam-se os VCs dos ensaios realizados, em duas condições diferentes, na ausência de nitrito e com o substrato em condições de saturação (6 mM).

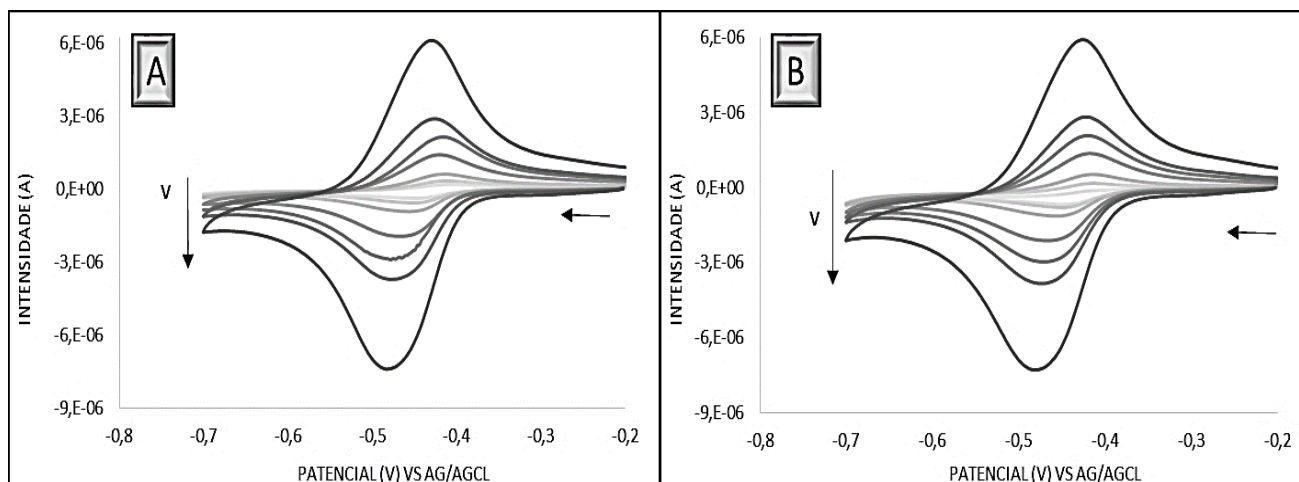


Figura 3.21 - Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica a deferentes velocidades de varrimento (5 a 200 mV/s), com a proteína *cit. cd<sub>1</sub>* imobilizados com membrana e o mediador redox fenilalanina (70  $\mu$ M) em solução. A – na ausência de nitrito, B – com saturação de nitrito (6 mM).

Caracterizando os VCs apresentados, verifica-se a existência da dependência entre a intensidade do sinal catódico e a respectiva velocidade de varrimento, observando-se que com a adição de concentração saturante de nitrito ocorre um aumento na intensidade da corrente, apesar de esse aumento ser reduzido. Quanto ao comportamento dos VCs, este não tomam um aspecto sigmoidal, não se verificando uma resposta catalítica por parte da enzima.

Avaliaram-se os VCs para cada velocidade de varrimento, carateriza-se o comportamento e a resposta catalítica apresentando-se os VCs para 5 e 200 mV/s.

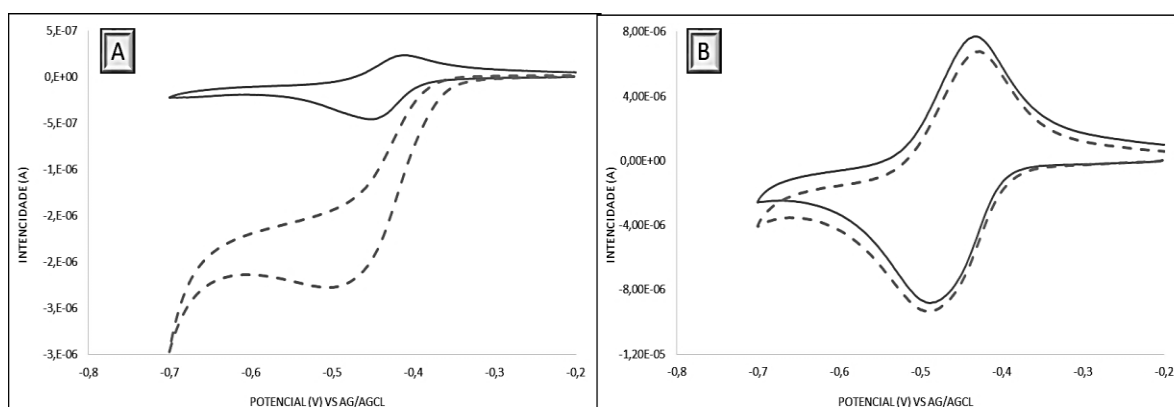


Figura 3.22- Voltamogramas cíclicos da resposta electroquímica da proteína *cit. cd<sub>1</sub>* imobilizada com membrana e o mediador redox fenosafranina (70  $\mu$ M), em solução. A – a 5 mV/s, B – a 200 mV/s; com os VCs na ausência de nitrito (—), e com saturação de nitrito (---).



Analizando a Figura 3.22, também para este mediador químico, verifica-se que existe uma resposta catalítica, por parte da enzima ao nitrito, apenas para velocidades de varrimento mais baixas. Já para velocidades de varrimento mais elevadas os VCs são, nas duas condições (ausência e saturação de nitrito), praticamente coincidente, evidenciando a ausência de resposta catalítica. Como este se trata de um mecanismo do tipo *EC'*, conclui-se que a transferência electrónica heterogénea ocorre mais rapidamente que a conversão do nitrito a óxido nítrico associada, como consequência de uma lenta transferência electrónica intermolecular. Desta forma, e uma vez que não existe resposta catalítica da enzima, as condições existente não permitem prosseguir com o estudo proposto.

Em suma, dos vários doadores electrónicos estudados, químicos e biológicos, apenas o cit. *c<sub>552</sub>* permitiu que a enzima apresenta-se uma resposta catalítica aquando da presença de substrato em condições saturantes, para o intervalo de velocidades de varrimento estudadas (5 a 200 mV/s). Todos os outros doadores de electrões estudados apenas permitiam a existência de resposta catalítica da enzima para velocidades de varrimento baixas (5 e 10 mV/s). Uma vez que apenas se tratavam de duas velocidades, para as quais os critérios para a determinação da constante de velocidade de transferência electrónica intermolecular eram cumpridos tornou-se impossível proceder à sua determinação.

Uma vez que o cit. *c<sub>552</sub>* se trata do parceiro redox fisiológico do cit. *cd<sub>1</sub>* NiR, e com os resultados de que este foi o único doador electrónico que se mostrou eficiente na transferência de electrões para a actividade enzimática, pode-se, assim, afirmar que o cit. *c<sub>552</sub>* possui uma especificidade para a activação do cit. *cd<sub>1</sub>*, permitindo desencadear as alterações estruturais necessárias.

### 3.5 INTERAÇÃO ENZIMA/DOADOR ELECTRÓNICO – *DOCKINGS*

Para se estudar e compreender o mecanismo de catálise enzimática do cit. *cd<sub>1</sub>* NiR, é necessário ter em atenção o fenómeno de activação, articulado à redução dos cofactores; assim sendo, caracterizar as interacções estabelecidas entre a proteína e o parceiro redox, permitirá compreender melhor como este fenómeno se processa.

Para tal, são necessárias as estruturas tridimensionais das proteínas envolvidas; como a estrutura da proteína de *M. hydrocarbonoclasticus* não foi determinada até à data, foi necessário simular a mesma, através de programas computacionais, por comparação com estruturas da proteína, de outros microrganismos.

#### 3.5.1 Estrutura tridimensional de cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*

Para se obter a estrutura quaternária da proteína cit. *cd<sub>1</sub>*, foi necessário avaliar as estruturas primárias da mesma proteína, proveniente de diferentes microrganismos e assim se verificar qual a que possui uma maior semelhança/homologia com a estrutura primária (sequência de aminoácidos) da proteína de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Com este fim, foram analisadas as sequências de aminoácidos da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus* (H8WEU2), *Ps. aeruginosa* (G8A456), *Ps. stutzeri* (I6WMF2) e *P. pantotrophus* (P72181); as quais se encontram depositadas na base de dados *UniProt*, estando os códigos referenciados. As cadeias polipeptídicas foram posteriormente alinhadas, através do servidor *UniProt*, tal como se pode observar na Figura 3.23.

Para uma avaliação mais pormenorizada dos alinhamentos, recorreu-se ao *software NCBI blast-protein*, o qual permitiu determinar o grau de homologia e de identidade entre as várias sequências primárias.

Figura 3.23- Alinhamento de sequências de cit. *cd1* NiR, dos microrganismos: *M. hydrocarbonoclasticus* (H8WEU2), *Ps. aeruginosa* (G8A456), *Ps. stutzeri* (I6WME2) e *P. pantotrophus* (PZ2181).

Sequências de microrganismo comparadas		Aminoácidos da sequência	Aminoácidos em posições idênticas	Homologia* (%)	Identidade* (%)
<b><i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i></b>	<b><i>Ps. aeruginosa</i></b>	568	396	98%	70%
	<b><i>P. stutzeri</i></b>	570	396	98%	70%
	<b><i>P. pantotrophus</i></b>	596	300	95%	63%

57

A análise da homologia das várias estruturas primárias permitiu identificar qual destas possui uma maior homologia com a sequência da proteína de *M. hydrocarbonoclasticus*, e por sua vez prever a estrutura tridimensional da mesma. Os resultados mais pormenorizados apresentam-se na Tabela 3.5, na qual se observa a percentagem de homologia, assim como a quantidade de aminoácidos que se encontram em posições semelhantes (identidade). Quanto maior a homologia e a identidade, maior a probabilidade da estrutura quaternária simulada corresponder à real.

Assim, verifica-se que existem duas estruturas primárias (*Ps. aeruginosa* e *Ps. stutzeri*) que apresentam um grau de homologia e identidade muito elevado (98% e 70%, respectivamente) com a sequência de *M. hydrocarbonoclasticus*, também verificado na literatura [27].

O programa computacional de modelação, *CPHmodels 3.2*, permitiu prever o esqueleto da estrutura tridimensional da proteína, apenas com recurso à sequência de aminoácidos. Assim sendo, esta foi inserida no programa, o qual com recurso à sua base de dados, promoveu um alinhamento com estruturas já conhecidas, ordenando-as por ordem de homologia e identidade. Este programa determinou o esqueleto proteico da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* de *M. hydrocarbonoclasticus* (Figura 3.24- A). Em termos de representação característica de proteínas, esta foi ajustada a partir dos dados fornecidos e recorrendo ao programa *UCSF Chimera 1.6.1*, adquirindo o aspecto presente na Figura 3.24-B.

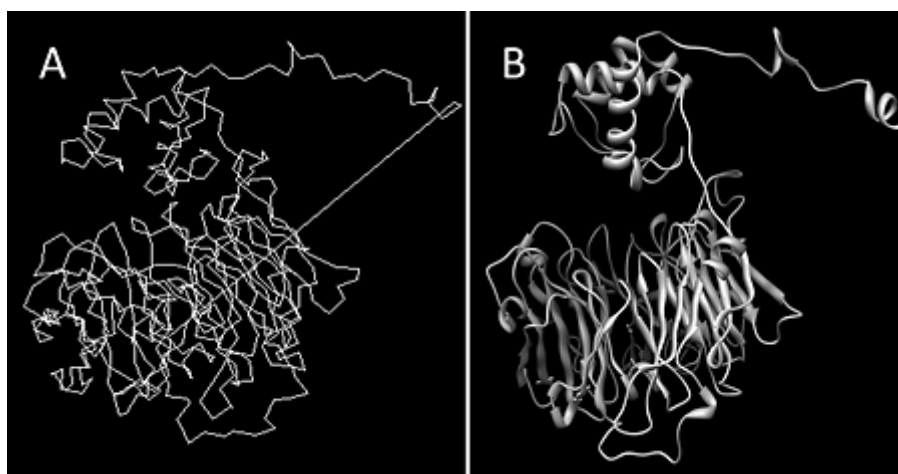


Figura 3.24- Modelos das estruturas tridimensionais de uma das subunidades estruturais (monómero), simulado pelo programa *CPHmodels 3.2*, para a proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*. A – estrutura proposta do “esqueleto” proteico, B – estrutura ajustada no programa *UCSF Chimera 1.6.1*.

A estrutura simulada, quando comparada por simples inspecção visual com a estrutura da proteína de *Ps. aeruginosa* (*template*), permite identificar bastantes semelhanças entre ambas. Mas para uma comparação mais criteriosa, recorreu-se à sobreposição das estruturas, simulada e *template*, estando esta representada na Figura 3.25.

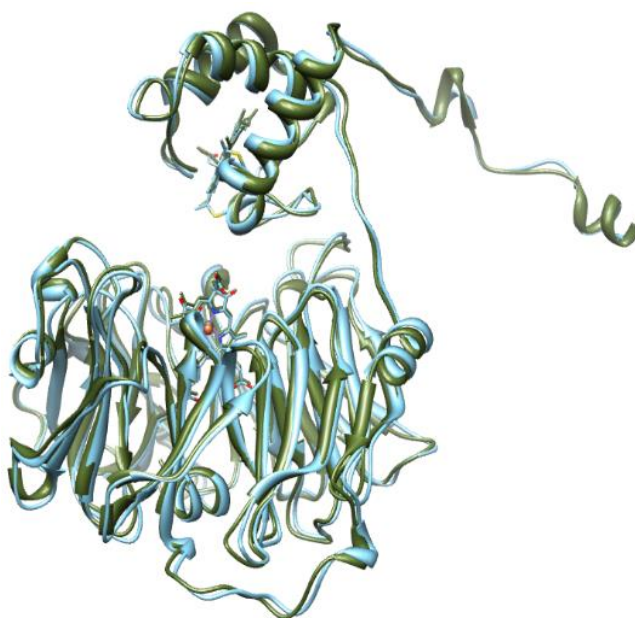


Figura 3.25- Sobreposição das estruturas monomérica de cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *Ps. aeruginosa* (PDB: **1GJQ**) a verde, com a estrutura simulada pelo programa *CPHmodels* 3.2, da mesma proteína mas de *M. hydrocarbonoclasticus*, a azul. Estruturas realizadas com recurso ao programa *Chimera* 1.6.1.

Verificou-se, assim, que as duas estruturas possuem uma identidade estrutural elevada, sendo o valor do seu rmsd (*root-mean-square deviation*) de 0,684 Å; portanto, os dois monómeros apresentam uma sobreposição de estrutura quase total, visto o valor do rmsd ser inferior a 1,5 Å [40]. Assim, a modelação aproxima-se bastante da estrutura *template* e esta pode ser utilizada como modelo para os estudos de interacção subsequentes.

Para melhor caracterizar a estrutura simulada, definiu-se a composição em aminoácidos na superfície das duas proteínas (*template* e simulada), através da representação do potencial coulombiano (distribuição de cargas à superfície), através do *software Chimera* 1.6.1, o qual se observa na Figura 3.26.

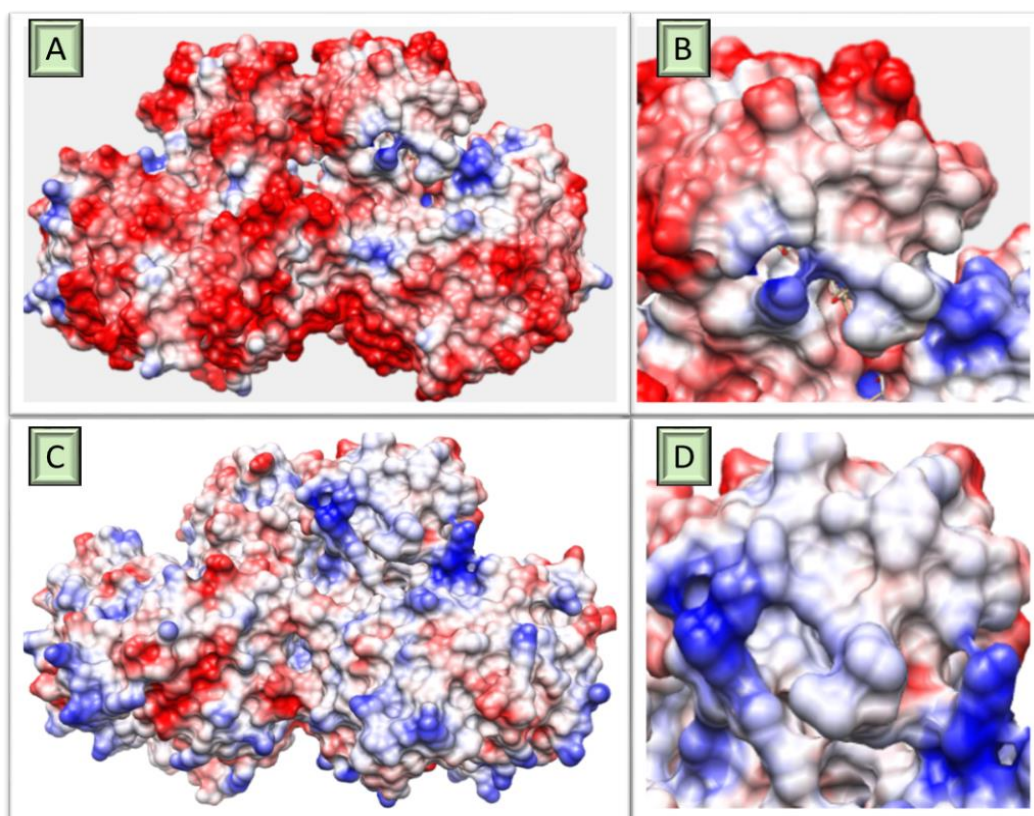


Figura 3.26- Mapeamento da distribuição de cargas à superfície (potencial coulombiano) da estrutura simulada para: A e B - proteína cit.  $cd_1$  NiR de *M. hydrocarbonoclasticus* e C e D - proteína cit.  $cd_1$  NiR de *Ps. aeruginosa*; utilizando 4,0 como o valor da constante dielétrica: A e C – totalidade da estrutura, B e D – zoom em torno do hemo c. Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.

Analisando a Figura 3.26, verifica-se uma diferença quanto à distribuição de cargas à superfície das estruturas tridimensionais e consequentemente, diferença nos aminoácidos que as constituem. Apesar das duas proteínas (cit.  $cd_1$ ) possuírem uma identidade de 70%, conclui-se que os restantes aminoácidos têm uma influência substancial na caracterização superficial, alterando a distribuição de cargas (resultado mais evidente). Contudo, um comportamento repete-se para ambos os cit.  $cd_1$ : os aminoácidos em torno do hemo do tipo c possuem carga neutra (branco), sendo os adjacentes a estes, maioritariamente carregados positivamente (azul) (Figura 3.26-B e D).

Outra das caracterizações feitas foi a avaliação da existência de possíveis canais na estrutura da proteína, para a transferência electrónica inter- e intramolecular, e observação do “local de entrada” da molécula de nitrito, até ao hemo  $d_1$ , no domínio catalítico. Para tal recorreu-se ao mapeamento da superfície da proteína (Figura 3.27).



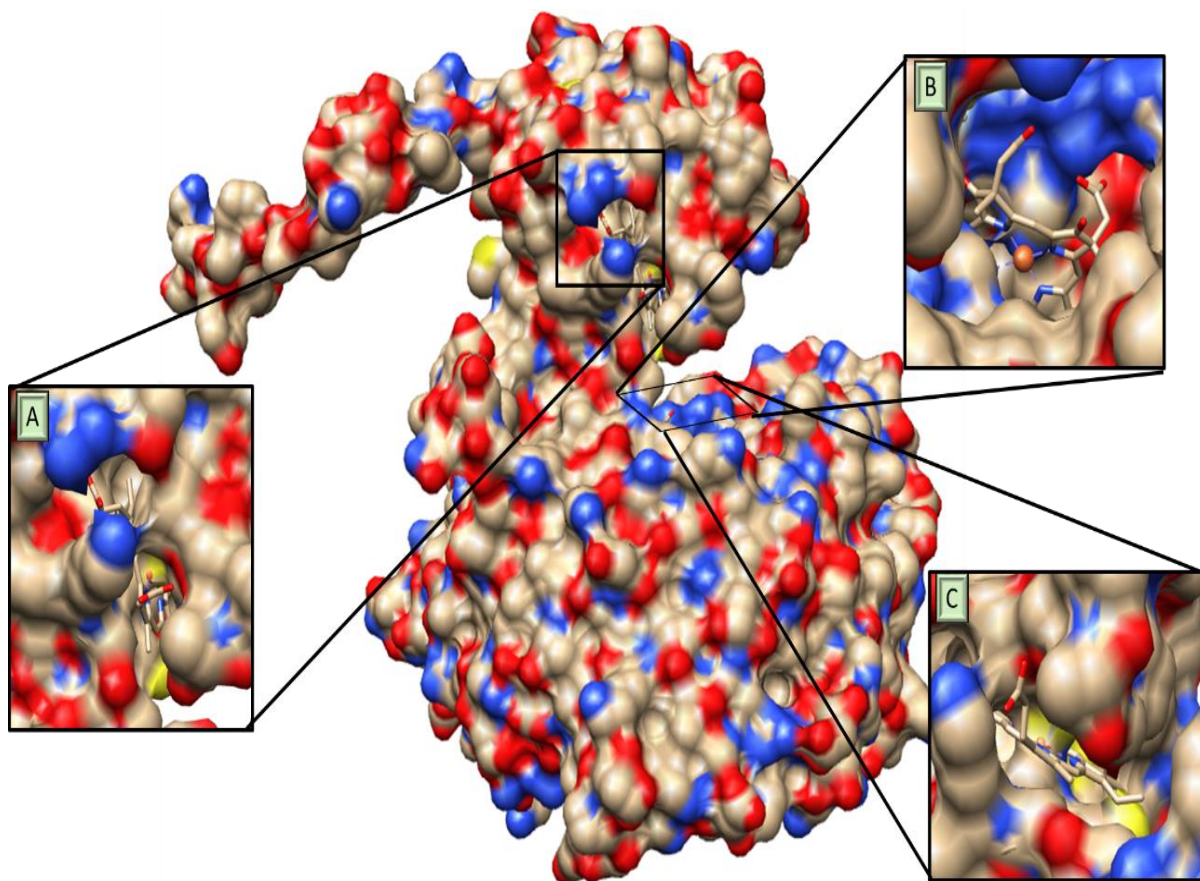


Figura 3.27- Mapeamento de superfície da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*. A – Vista do hemo do tipo c; B – vista superior do hemo do tipo *d<sub>1</sub>*; C – vista inferior do hemo do tipo c. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.

Verificou-se uma região que, na superfície do domínio de transferência electrónica, possui um possível canal, o qual pode permitir a transferência electrónica intermolecular, entre o doador de electrões e o hemo c da enzima, pois nessa região não se observam impedimentos estruturais de aminoácidos (Figura 3.27- A). Seguidamente, observa-se a continuação desse canal, em forma de um “cotovelo”, localizando-se o átomo de ferro do hemo c no seu interior (Figura 3.27-C), esta segunda parte do canal (após o hemo c) estabelece uma ligação directa entre os dois grupos hémicos do cit. *cd<sub>1</sub>*, permitindo que ocorra a transferência electrónica intramolecular, pois não existem impedimentos estruturais de aminoácidos adjacentes. Por fim, verifica-se uma acessibilidade ao hemo *d<sub>1</sub>* (local da catálise do  $\text{NO}_2^-$  a NO), desde a superfície da proteína, mediante a existência de uma cavidade, a qual permite a entrada da molécula do substrato ( $\text{NO}_2^-$ ), coordenando-se este com o hemo *d<sub>1</sub>*, (Figura 3.27-B), no domínio onde será convertido e dará origem o produto final da reacção, o NO.

### 3.5.2 Caso de estudo – *Pseudomonas aeruginosa*

Uma vez que a estrutura cristalina de cit.  $cd_1$  NiR, de *M. hydrocarbonoclasticus*, ainda não está determinada, apresentando-se a sua modelação nesta tese (secção 3.5.1); decidiu fazer-se o estudo com o cit.  $cd_1$  de *Ps. aeruginosa*, de modo a prever o tipo de interações estabelecidas com o seu parceiro fisiológico redox (cit.  $c_{551}$ ); e com o citocromo *c* de coração de cavalo, que é um transportador eletrónico biológico por excelência.

Para se desenvolver este estudo, recorreu-se ao algoritmo *BiGGER* (*Biomolecular Complex Generator with Global Evaluation and Ranking*) [41], o qual apresentou conjuntos de 5000 possíveis locais de interação, organizando-os segundo um *ranking* energético, tendo em conta várias categorias de interações estabelecidas.

#### 3.5.2.1 Citocromo $cd_1$ NiR de *Pseudomonas aeruginosa*/citocromo $c_{551}$

O primeiro conjunto enzima/parceiro redox avaliado foi o cit.  $cd_1$  NiR com o seu parceiro redox fisiológico, o cit.  $c_{551}$ . Primeiramente, e de forma a avaliar a influência do estado de oxidação do parceiro redox nas interações estabelecidas, foram simulados várias combinações das proteínas, nos diferentes estados de oxidação. Na Tabela 3.6 apresentam-se as combinações estudadas.

Tabela 3.6- Combinações de proteína cit.  $cd_1$  NiR e parceiro redox, cit.  $c_{551}$ , em diferentes estados de oxidação, utilizadas na modelação dos *dockings* e os respectivos códigos do PDB.

PDB	Parceiro redox	Proteína	Estado de oxidação	PDB
<b>351C</b>	Citocromo $c_{551}$ Oxidado [29]	cit. $cd_1$ NiR	Oxidado [15]	<b>1NIR</b>
			Reduzido com CN [42]	<b>1GJQ</b>
			Reduzido com NO [20]	<b>1NNO</b>
			Semi-reduzido [43]	<b>1N50</b>
<b>451C</b>	Citocromo $c_{551}$ Reduzido [29]	cit. $cd_1$ NiR	Oxidado	<b>1NIR</b>
			Reduzido com CN	<b>1GJQ</b>
			Reduzido com NO	<b>1NNO</b>
			Semi-reduzido	<b>1N50</b>

Inicialmente observaram-se os resultados obtidos para avaliar a influência do estado de oxidação do cit.  $c_{551}$  nas interações estabelecidas com o cit.  $cd_1$ , representando-os sob a forma de um *ranking* das 100 interações mais favoráveis energeticamente, dentro de cada parâmetro em análise.



Na Figura 3.28 apresentam-se, a título de exemplo, duas representações para os mesmos parâmetros (tipos de interacção estabelecidos), diferenciando-se entre si no estado de oxidação do parceiro redox.

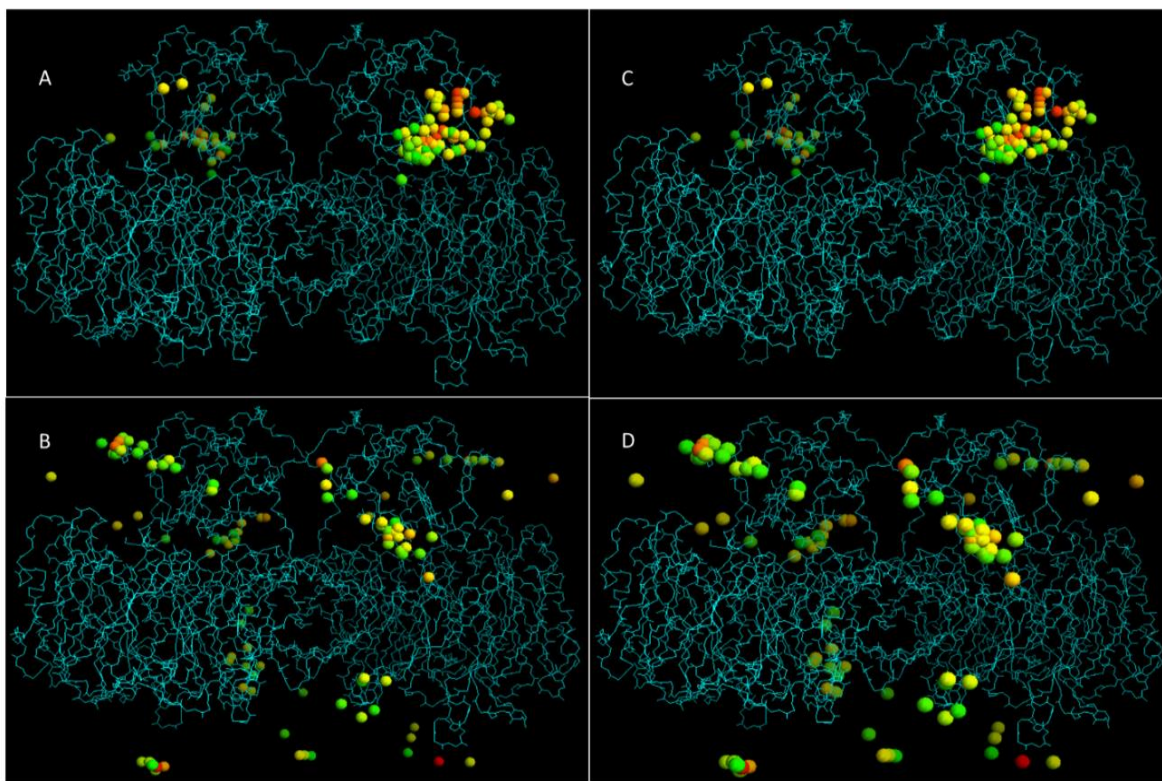


Figura 3.28- Representação do ranking das 100 interacções mais favoráveis, entre cit.  $cd_1$  NiR e o cit.  $c_{551}$ , com dois estados de oxidação do parceiro redox, sendo a estrutura oxidada da proteína cit.  $cd_1$ ; e para dois parâmetros de interacção (*global score* e hidrofóbico). A e B – cit.  $c_{551}$  na forma oxidada; C e D – cit.  $c_{551}$  na forma reduzida; A e C – representação das interacções hidrofóbica; B e D – representação do *global score*. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente.

Através desta análise, é possível afirmar que o estado de oxidação do parceiro redox não implica qualquer alteração nas interacções estabelecidas, pelo que as avaliações seguintes (mais pormenorizadas) apenas se basearam nos *dockings* referentes à forma oxidada do cit.  $c_{551}$ . Também é possível verificar que o tipo de interacção que melhor cumpre a hipótese, na qual a transferência electrónica intermolecular ocorre entre o mediador redox e o hemo *c* da enzima, é do tipo hidrofóbico.

O passo seguinte tratou-se da avaliação, para os vários estados de oxidação da enzima, do tipo de interacção que se apresenta como o mais favorável para uma transferência electrónica intermolecular eficiente, podendo concluir-se que se trata, novamente, do tipo hidrofóbico (Figura 3.29).

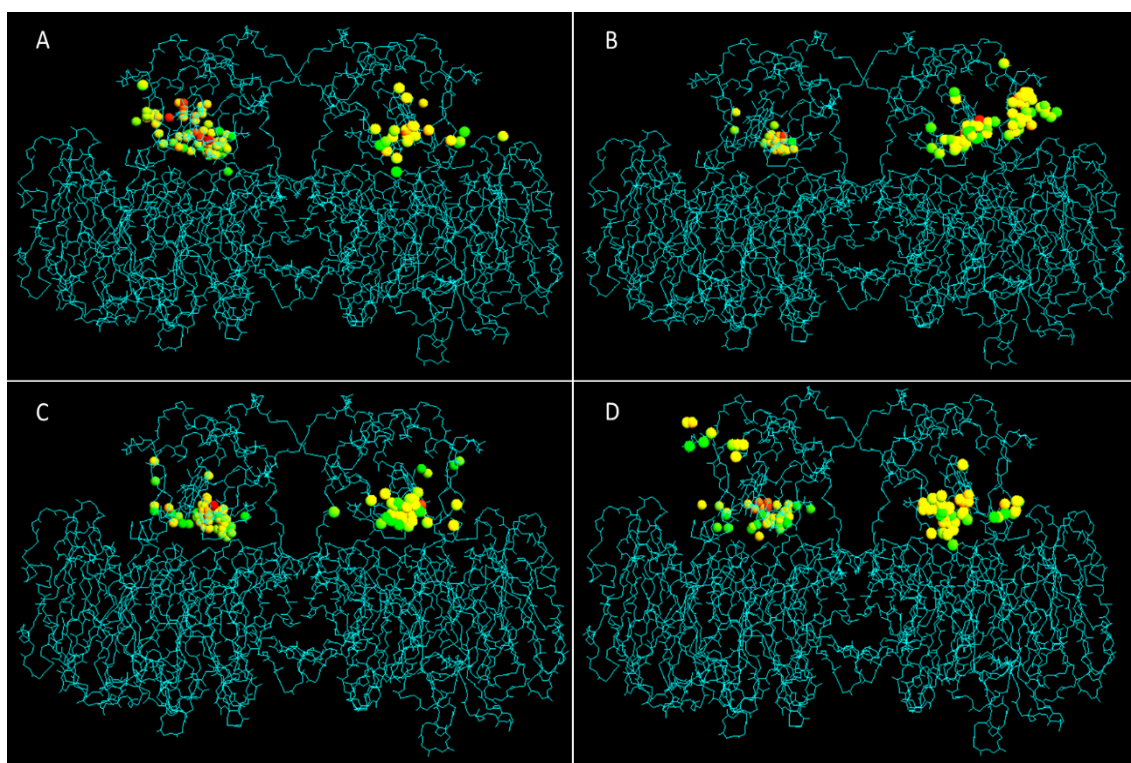


Figura 3.29- Representação do ranking das 100 interações mais favoráveis do tipo hidrofóbica, entre cit.  $cd_1$  NiR (nos diferentes estados de oxidação) e o cit.  $c_{551}$  na sua forma oxidada. Cit.  $cd_1$  NiR na sua forma: A – oxidada; B – reduzida com CN; C – reduzida com NO e D – semi-reduzida. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente.

Seguidamente passou-se à avaliação dos rankings apresentados pelo algoritmo *BiGGER* através dos quais se seleccionou um conjunto das 12 soluções mais favoráveis energeticamente, em cada categorias de interação (global score, hidrofóbica e geométrica). Essa selecção foi feita tendo em conta dois critérios: i) a posição em que se encontra o parceiro redox deve cumprir a hipótese da transferência electrónica intermolecular ocorra entre parceiro redox e o hemo *c* da enzima; e ii) garantir que a distância entre os átomos de ferro dos hemos *c*, da enzima (cit.  $cd_1$ ) e do parceiro, não deve ser superior a 20 Å (teoria de Marcus); uma vez ser esta a distância máxima que se estipula ser possível ocorrer trocas electrónicas [43-44]. Este conjunto foi denominado por “top 12”.

Posteriormente, e para uma avaliação mais criteriosa, seleccionou-se um novo conjunto de resultados, nomeado “top 5”, que resulta de uma nova selecção dos resultados anteriormente seleccionados (“top 12”), os quais apresentam as menores distâncias Fe-Fe. Os valores médios dessas distâncias apresentam-se na Tabela 3.7.

*Tabela 3.7-* Valores médios das distâncias entre o átomo de Fe do hemo *c* do parceiro redox, o cit. *c*<sub>551</sub> e o Fe do hemo *c* da proteína cit. *cd*<sub>1</sub> NiR, de *Ps. aeruginosa*, dos “top 12” e “top 5”, para os diferentes estados de oxidação a enzima e para as diferentes categorias de interacção.

Pseudomonas aeruginosa		Categoria Interacção	Distância Fe-Fe (Å)	
Citocromo c 551	Citocromo <i>cd</i> <sub>1</sub> NiR		Média “top 12”	Média “top 5”
Oxidado	Oxidada	Global score	16.298	14.592
		Hidrofóbico	14.419	13.308
		Geométrico	18.216	17.250
	Reduzida com CN	Global score	15.402	14.224
		Hidrofóbico	15.165	13.632
		Geométrico	17.570	16.612
	Reduzida com NO	Global score	16.504	15.324
		Hidrofóbico	14.542	13.244
		Geométrico	16.942	15.232
	Semi-reduzida	Global score	16.227	14.982
		Hidrofóbico	14.690	13.088
		Geométrico	18.461	17.080

Através da análise dos valores médios das distâncias Fe-Fe comprova-se, mais uma vez, que as interacções do tipo hidrofóbico são as que promovem uma transferência electrónica intermolecular possivelmente mais eficiente, uma vez que apresentam distâncias menores entre átomos de ferro. Verifica-se também que o estado de oxidação da enzima não tem uma influência significativa no tipo de interacção estabelecida, uma vez que as distâncias apresentadas são muito semelhantes. Este resultado pode dever-se ao tamanho reduzido do parceiro redox (9 kDa [18]), quando comparado ao da enzima; e ao facto do hemo *c* do cit. *c*<sub>551</sub> se encontrar exposto na sua superfície. Verifica-se que as distâncias médias das interacções mais favoráveis (hidrofóbicas) tomam valores próximos a 14 Å, o que permite afirmar que estas são trocas electrónicas eficientes [46].

De seguida, passou-se para a análise das soluções agrupadas no “top 5”, desta vez com recurso a um novo algoritmo, o *PDBePisa*; este permite avaliar quais os aminoácidos que, em ambas as sequências polipeptídicas, estabelecem interacções e identificar a natureza das mesmas. Para melhor se observar as regiões da estrutura primária do cit. *cd*<sub>1</sub> que estabelecem interacções com o cit. *c*<sub>551</sub> e *vice-versa*, apresentam-se na Figura 3.30 os “Hits” desses aminoácidos. A forma de interacção representada são pontes de hidrogénio, pois estas são observadas em maior número.

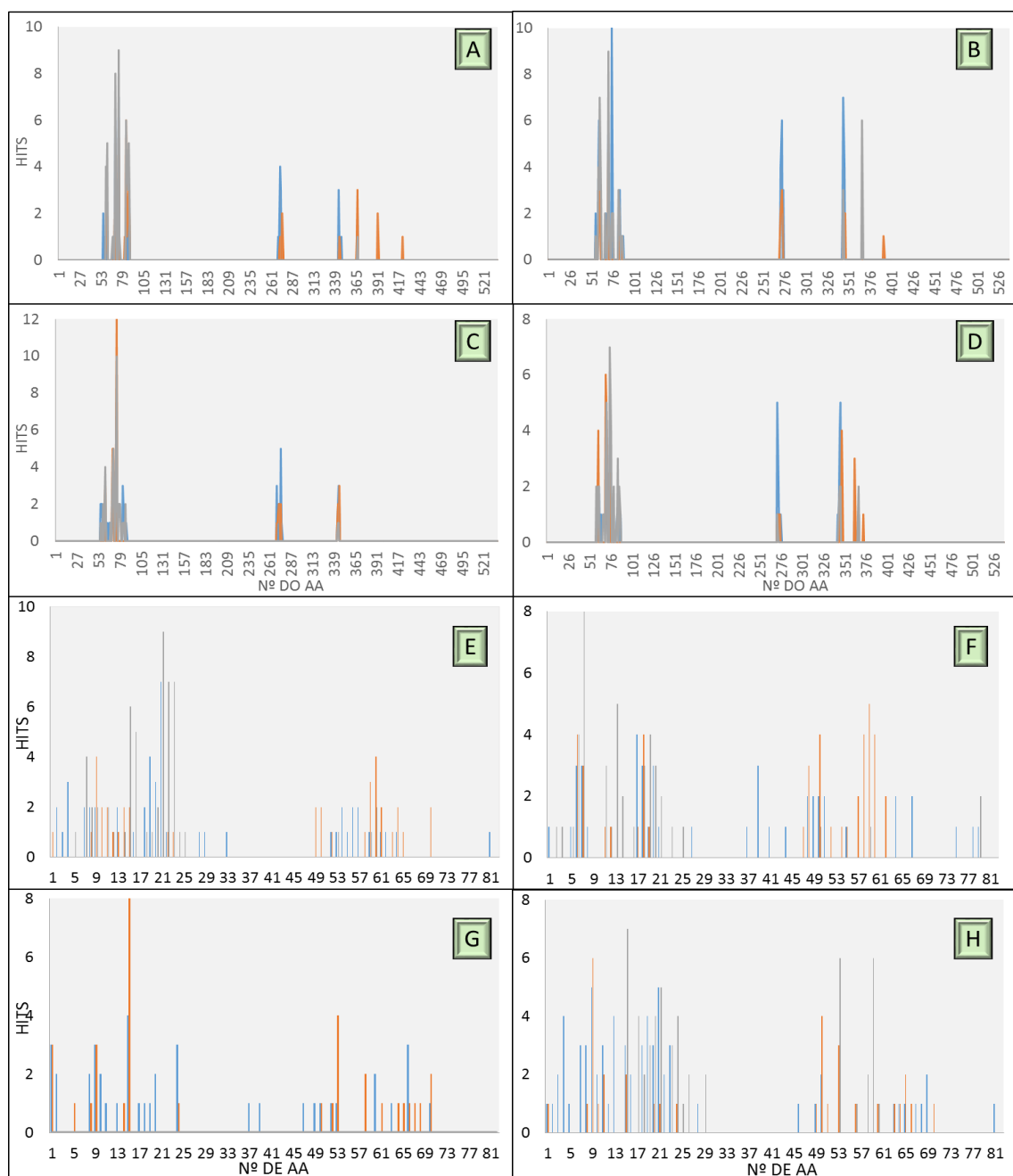
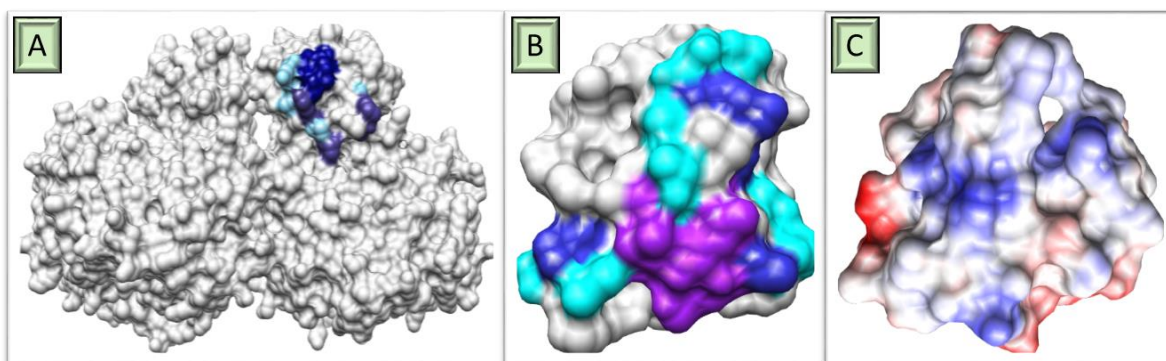


Figura 3.30- Distribuição na cadeia polipeptídica da cit. *cd*<sub>1</sub> NiR e do cit. *c*<sub>551</sub> de *Ps. aeruginosa* dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. *c*<sub>551</sub> e a proteína, respectivamente. Resultados dos vários *dockings* do parceiro no estado oxidado e a enzima em diferentes estados de oxidação: A e E- oxidada, B e F- semi-reduzida, C e G- reduzida com CN, e D e H- reduzida com NO. Sendo a cadeia polipeptídica da cit. *cd*<sub>1</sub> NiR representada de A – D; e a cadeia polipeptídica do cit. *c*<sub>551</sub> representada de E – H. Diferenciado o tipo de interacção por cores: Geométrica – azul, Global score – laranja e Hidrofóbico – cinza.

Numa primeira abordagem dos resultados apresentados constata-se que, para qualquer estado de oxidação da enzima cit. *cd*<sub>1</sub>, existem três regiões preferenciais que interagem com o parceiro redox, sendo numa delas mais evidente o maior número de interações estabelecidas com o cit. *c*<sub>551</sub>. Essa região localiza-se na estrutura primária, entre os aminoácidos 59-87, que constituem o domínio da possível transferência electrónica, portanto uma região próxima ao

hemo *c*, localizando-se as outras duas regiões na sequência de aminoácido constituintes do domínio catalítico. Já no caso da sequência do cit. *c*<sub>551</sub>, observam-se duas regiões que interagem mais frequentemente localizadas, uma junto ao N-terminal (aa. 1-20) e outra na extremidade oposta da sequência primária (aa. 46-70).

Contudo, a análise anterior apenas indica as regiões de aminoácidos interactuantes da estrutura primária, não podendo concluir-se como estes se encontram distribuídos nas estruturas tridimensionais das proteínas. Assim, observa-se essa distribuição espacial na Figura 3.31.



*Figura 3.31-* Representação do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com enzima/parceiro redox. As duas proteínas encontram-se nas suas formas oxidadas e o tipo de interacções estabelecidas são hidrofóbicas. A – cit. *cd*<sub>1</sub> NiR; B - cit. *c*<sub>551</sub>; C - distribuição de cargas à superfície (potencial coulombiano) da proteína cit. *c*<sub>551</sub> de *Ps. aeruginosa*, utilizando 4,0 como o valor da constante dielétrica. Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.

Assim, verifica-se que na estrutura do cit. *cd*<sub>1</sub>, os aminoácidos que interagem mais fortemente pelas soluções mais prováveis e previstas pelo algoritmo *BiGGER*, se localizam em redor do hemo *c*, favorecendo a hipótese de transferência de electrões intermolecular ocorrer com este cofactor da enzima. Em contrapartida, os aminoácidos do cit. *c*<sub>551</sub> que interagem mais fortemente com a enzima não estão tão concentrados na superfície da molécula. Todavia, esta proteína possui o hemo *c* mais exposto, permitindo reduzir a distância entre os Fe dos dois grupos hémicos *c* (enzima e parceiro), qualquer que seja a orientação e uma vez que os aminoácidos interactuantes se encontram dispersos numa grande área superficial.

A distribuição dos aminoácidos que interagem pode ser corroborada com a análise da distribuição de cargas na superfície das proteínas. Como se pode ver nas Figura 3.26-C e D da secção 3.5.1, os aminoácidos que se encontram em torno do hemo *c* do cit. *cd*<sub>1</sub> de *Ps. aeruginosa* são de carga neutra e os adjacentes a estes são carregados positivamente. Já no cit. *c*<sub>551</sub>, a distribuição de cargas encontra-se de forma semelhante em torno do hemo (aa. neutros) mas em redor destes encontram-se aminoácidos carregados negativamente (Figura 3.31-C). Esta

distribuição complementar de cargas, entre as duas proteínas, permite que se estabeleçam interacções de uma forma mais eficaz, uma vez que não existem repulsões electrostáticas, tornando o par enzima/parceiro redox funcional.

### 3.5.2.2 Citocromo $cd_1$ NiR de *Pseudomonas aeruginosa*/citocromo c coração de cavalo

Realizou-se um segundo *caso de estudo* para o cit.  $cd_1$  NiR de *Ps. aeruginosa*, tendo desta vez como parceiro redox o citocromo c de coração de cavalo, doador electrónico biológico mas não fisiológico, de *Ps. aeruginosa*. Iniciou-se a análise com a selecção do “top 12” e posteriormente do “top 5”, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.8.

*Tabela 3.8-* Valores médios das distâncias entre o átomo de Fe do hemo c do parceiro redox, o cit. c e o Fe do hemo c da proteína cit.  $cd_1$  NiR, de *Ps. aeruginosa*, dos “top 12” e “top 5”, para os diferentes estados de oxidação a enzima e para as diferentes categorias de interacção.

Pseudomonas aeruginosa		Categoria Interacção	Distância Fe-Fe (Å)	
Coração de cavalo	Citocromo $cd_1$ NiR		Média “top 12”	Média “top 5”
Citocromo c	Oxidada	Global score	17.206	16.794
		Hidrofóbico	13.808	12.208
		Geométrico	17.273	14.780
	Reduzida com CN	Global score	16.100	14.258
		Hidrofóbico	13.688	12.382
		Geométrico	15.885	12.790
	Reduzida com NO	Global score	16.398	14.202
		Hidrofóbico	14.844	13.224
		Geométrico	16.015	13.362
	Semi-reduzida	Global score	18.208	17.066
		Hidrofóbico	15.562	12.776
		Geométrico	18.748	17.896

Como se pode constatar pelos valores médios das distâncias Fe-Fe apresentados, o tipo de interacção hidrofóbica é o que apresenta menores distâncias, independentemente do estado de oxidação da enzima, ou seja, o estado de oxidação desta não origina alteração conformacional que impeça ou dificulte a interacção entre os hemos c, do doador e a enzima. Verifica-se que os valores apresentados são inferiores a 14 Å [46], portanto estas interacções possibilitam uma transferência electrónica intermolecular eficiente.



Seguidamente foi avaliada o tipo de interação estabelecida, mais favorável energeticamente (Figura 3.32). Concluindo-se que se trata do tipo hidrofóbico, para qualquer estado de oxidação da enzima, tal como observado anteriormente.

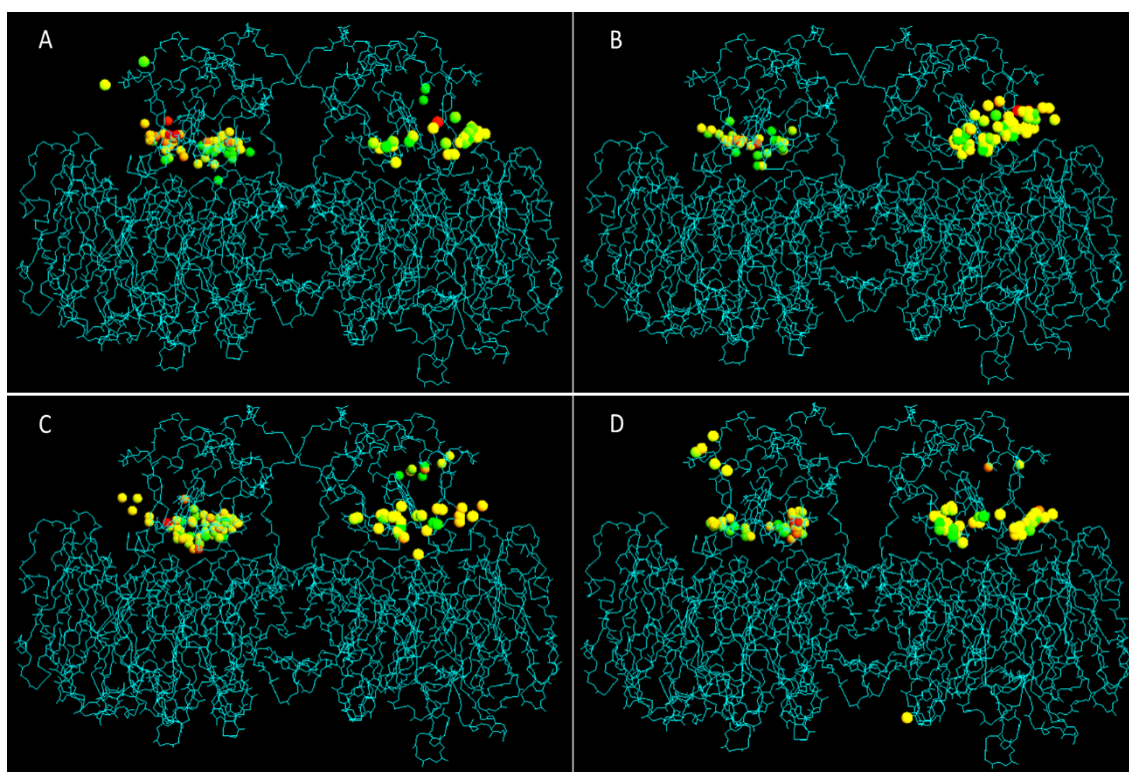
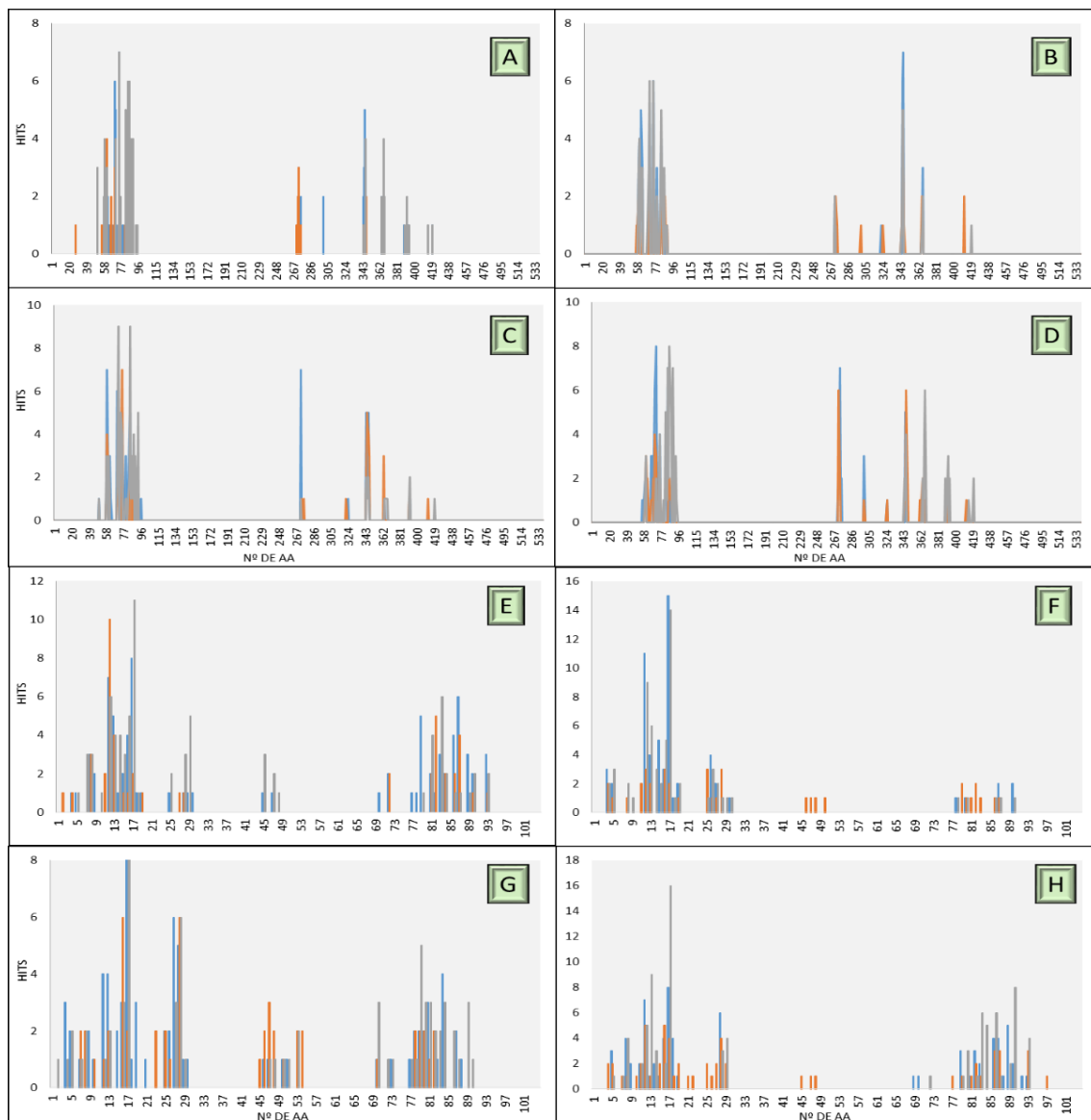


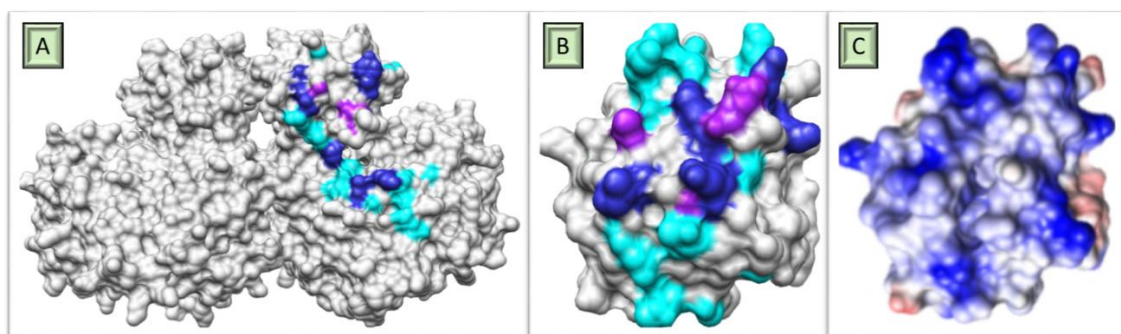
Figura 3.32- Representação do ranking das 100 interações do tipo hidrofóbico mais favoráveis entre cit.  $cd_1$  NiR (nos diferentes estados de oxidação) e o cit. c de coração de cavalo. Cit.  $cd_1$  NiR na sua forma: A – oxidada; B – reduzida com CN; C – reduzida com NO e D – semi-reduzida. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente.

O passo seguinte consistiu numa análise pormenorizada do “top 5”, na qual se verificaram os aminoácidos que interagem mais fortemente no par enzima/parceiro redox. Os resultados desta análise encontram-se apresentados na Figura 3.33, nesta podem observar-se as regiões das cadeias polipeptídicas, da cit.  $cd_1$  e do parceiro cit. c, que interagem em maior número, sendo evidenciado o tipo de interação estabelecida.

Observando a distribuição nas duas cadeias polipeptídicas, verifica-se que na enzima cit.  $cd_1$ , os aminoácidos encontram-se concentrados em três regiões, sendo uma preferencial em número de interações estabelecidas e localiza-se no domínio que acomoda o hemo c (aa. 59-93). Nas outras regiões, os aminoácidos encontram-se localizados de uma forma mais dispersa e as interações são em menor número. Já na estrutura primária do cit. c, observa-se a existência de 3 regiões de aminoácidos que estabelecem interações, no entanto muito dispersos ao longo da cadeia polipeptídica.



**Figura 3.33-** Distribuição, na cadeia polipeptídica da cit. *cd<sub>1</sub> NiR* de *Ps. aeruginosa* e do cit. *c* de coração de cavalo, dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogênio com o parceiro redox cit. *c* e a proteína, respectivamente. Resultados dos vários *dockings* do parceiro e a enzima em vários estados de oxidação: A e E- oxidada, B e F- semi-reduzida, C e G- reduzida com CN, e D e H- reduzida com NO. Sendo a cadeia polipeptídica da cit. *cd<sub>1</sub> NiR* representada de A – D; e a cadeia polipeptídica do cit. *c* de coração de cavalo representada de E – H. Diferenciado o tipo de interação por cores: Geométrica- azul, Global score- laranja e Hidrofóbico- cinza



**Figura 3.34-** Representação do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogênio, interagindo com o parceiro redox/ proteína. As duas proteínas encontram-se nas suas formas oxidadas e o tipo de interações estabelecidas são hidrofóbicas. A – cit. *cd<sub>1</sub> NiR*; B - cit. *c* de coração de cavalo; C- distribuição de cargas à superfície (potencial coulombiano) da proteína cit. *c* de coração de cavalo. Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa *Chimera 1.6.1*.



Observa-se que, na estrutura tridimensional do cit. *cd<sub>1</sub>*, a zona que interage com o parceiro redox encontra-se concentrada em torno do hemo *c* (Figura 3.34-A), o que permite que exista uma transferência electrónica intermolecular eficiente entre as duas proteínas (entre os hemos *c*). Verifica-se, também, que existem aminoácidos pertencentes ao domínio catalítico, os quais estabelecem interacções, de modo a estabilizar a relação entre as duas proteínas. Já na situação do cit. *c*, verifica-se que os aminoácidos que interagem mais fortemente encontram-se em redor do grupo hémico do tipo *c* (Figura 3.34-B), permitindo assim troca electrónica mais eficiente.

A distribuição dos aminoácidos interactuantes pode ser justificada através da distribuição de cargas à superfície das proteínas. Como se pode verificar na Figura 3.26-C e D da secção 3.5.1, os aminoácidos que se encontram em torno do hemo *c* (cit. *cd<sub>1</sub>*) são de carga neutra e os adjacentes destes são carregados positivamente. Já no caso do cit. *c*, a distribuição de cargas evidencia a presença de aminoácidos neutros junto ao grupo hémico e, adjacente a estes encontram-se aminoácido de positivos (Figura 3.34-C), tal com praticamente a globalidade da estrutura proteica (pI=10 [30]).

Em suma, apesar do cit. *c* de coração de cavalo não ser o parceiro redox fisiológico da enzima cit. *cd<sub>1</sub>* de *Ps. aeruginosa* e estar referenciado na literatura que este não favorece a transferência electrónica intermolecular [18], os resultados obtidos nesta secção contradizem essas deduções, ou seja, este parceiro estabelece interacções hidrofóbicas com a enzima a curta distancia ( $\approx 13$  Å), permitindo a troca de electrões entre ambas. Desta forma coloca-se em questão quanto à funcionalidade deste complexo proteico.

### 3.5.3 Citocromo *cd<sub>1</sub>* NiR de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

A enzima cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus* é a proteína alvo deste estudo. No entanto, apenas se conhece a estrutura tridimensional simulada neste trabalho (secção 3.5.1), com a qual se procedeu à análise das interacções estabelecidas entre a enzima e os parceiros redox.

### 3.5.3.1 Mediadores biológicos

Este estudo decorreu de forma similar ao apresentado na secção 3.5.2, avaliando as interacções do parceiro redox fisiológico putativo, o citocromo  $c_{552}$ , e uma proteína transportadora de electrões, o citocromo  $c$  de coração de cavalo.

#### a) Citocromo $c_{552}$

O citocromo  $c_{552}$  é uma pequena proteína proveniente da mesma bactéria que o cit.  $cd_1$  NiR (*M. hydrocarbonoclasticus*). Assim, as previsões das interacções estabelecidas com estas proteínas podem ajudar a compreender os fenómenos que ocorrem laboratorialmente.

Inicialmente foi realizado o estudo para as duas formas estruturais em que o cit.  $c_{552}$  se pode encontrar em solução, isto é, monomérica ou dimérica [5, 44]. Neste estudo seguiu-se o mesmo procedimento apresentado para o caso de estudo da proteína de *Ps. aeruginosa*.

Primeiramente avaliou-se o tipo de interacção que, de uma forma energeticamente favorável, possibilite o docking entre o parceiro redox e o hemo  $c$  do cit.  $cd_1$ . Assim, apresentam-se na Figura 3.35 o ranking das 100 interacções mais favoráveis, sendo estas diferenciadas segundo o tipo de interacção estabelecida, estes resultados são referentes ao monómero e dímero do cit.  $c_{552}$ .

Conclui-se que as interacções do tipo hidrofóbicas possibilitam a transferência electrónica entre as duas proteínas, pois para este tipo de interacção verifica-se um maior número soluções concentradas preferencialmente junto ao hemo  $c$ , apesar de se observar a existência de outras soluções dispersas pela estrutura da enzima. Verifica-se também uma segunda região estrutural, na qual se observam possíveis interacções (base do cit.  $cd_1$ , entre os dois domínios catalíticos). Isto pode dever-se a uma possível região de “encaixe” geométrico aí existente. Todos estes factos ocorrem em ambas as situações (parceiro redox na forma monomérica e dimérica), pelo que nesta análise primária não é possível prever qual das formas do parceiro redox seja mais favorável para a transferência electrónica intermolecular.

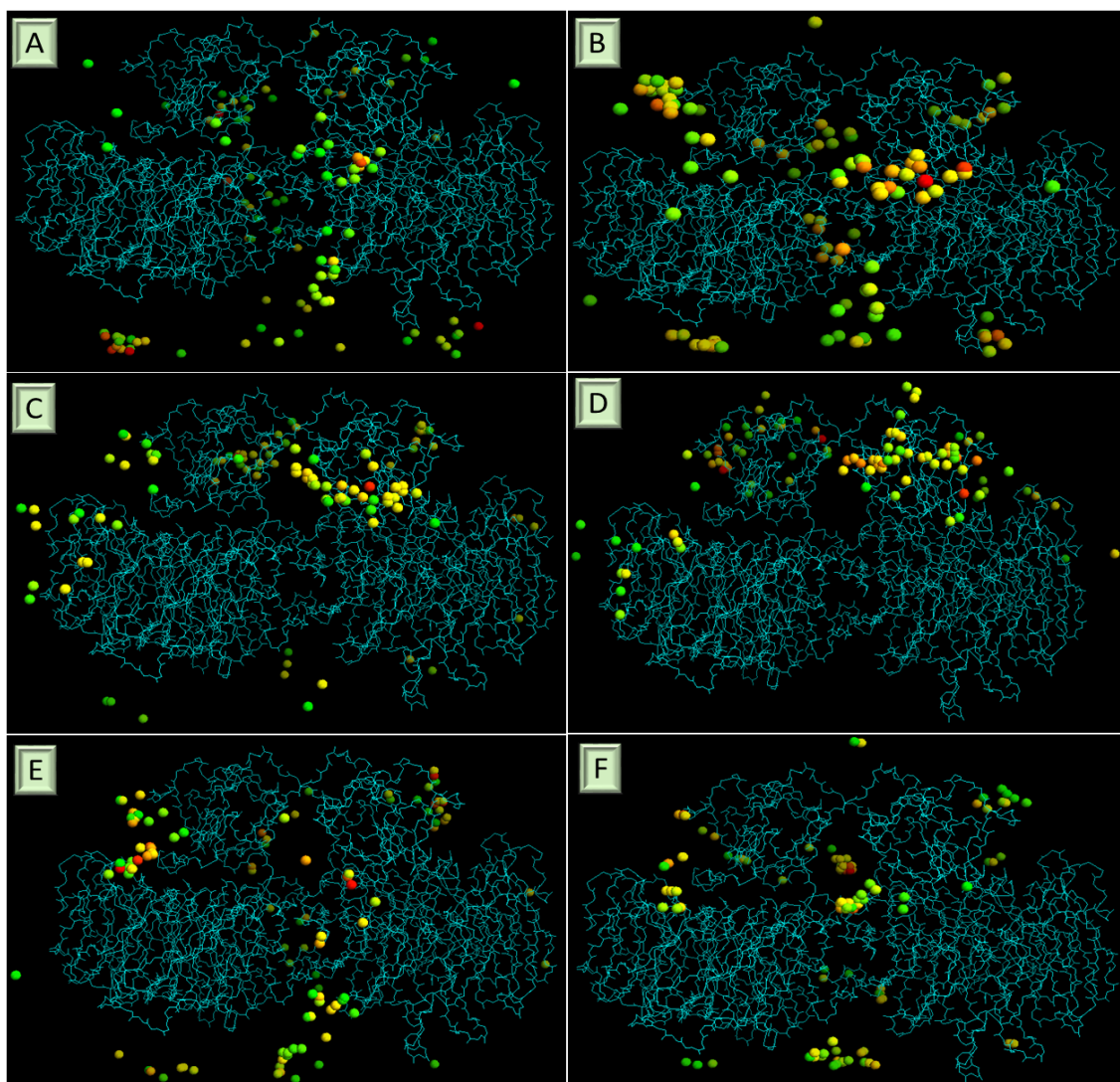


Figura 3.35- Representação do ranking das 100 interações mais favoráveis entre cit. *cd*<sub>1</sub> NiR e o cit. *c*<sub>552</sub>, nas suas formas monomérica e dimérica; para três tipos de parâmetros de interação: *global score*, hidrofóbico e geométrico. A, C e E – mediador na forma dimérica; B, D e F – mediador na forma monomérica; A e B – representação do *global score*; C e D – representação das interações hidrofóbica; E e F – representação das interações geométricas. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente.

Seguidamente procedeu-se à selecção das soluções que apresentam distâncias, inferiores a 20 Å, entre os átomos de ferro (do hemo *c* da proteína e do parceiro). Estas interações foram organizadas no “top 12”, e dentro deste ranking foram seleccionadas as 5 que apresentavam as menores distâncias, o “top 5”. Estas duas selecções encontram-se apresentadas na Tabela 3.9, na qual se faz referência às distâncias médias, sendo diferenciadas consoante o tipo de interacção que estabelecem com a enzima e pela forma estrutural do parceiro redox.

Tabela 3.9- Valores médios das distâncias, do “top 12” e do “top 5”, entre o átomo de Fe do hemo c do mediador, cit. *c<sub>552</sub>* (dímero e monómero) e o Fe do hemo do tipo c da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*, diferenciando-se várias categorias de interação.

M. hydrocarbonoclasticus		Categoria Interação	Distância Fe-Fe (Å)	
<u>Citocromo cd1</u> <u>NiR</u>	<u>Citocromo c<sub>552</sub></u>		Média “top 12”	Média “top 5”
	Monomérico	Global score	15.193	14.958
		Hidrofóbico	15.052	14.558
		Geométrico	-	-
	Dimérico	Global score	15.993	14.946
		Hidrofóbico	16.452	14.744
		Geométrico	16.198	15.294

Analisando mais pormenorizadamente os valores apresentados, comprova-se que as interações hidrofóbicas são as que apresentam menores distâncias Fe-Fe, apesar de não ser muito evidente a diferença de distância entre os vários tipos de interações. Verifica-se também, que entre as duas formas monomérica e dimérica do parceiro redox, a forma monomérica é a que apresenta uma distância menor entre átomos de ferro, isto pode dever-se ao menor volume estrutural, reduzindo assim o possível impedimento estereoquímico ou devendo-se essa diferença a um simples artefacto.

De forma mais criteriosa avaliou-se o “top 5”, verificando-se os aminoácidos que, na cadeia polipeptídica da enzima e do parceiro redox, estabelecem interações (Figura 3.36).

Analisando brevemente essa distribuição de aminoácidos das estruturas primárias do para enzima/parceiro redox, que interagem. Verifica-se que, na sequência polipeptídica do cit. *cd<sub>1</sub>* existem duas regiões preferenciais para estabelecer interações, tendo uma delas um maior número de aminoácidos interactuantes, pertencendo ao domínio que acomoda o hemo c (aa. 58-93); outra é composta por aminoácidos da região que constitui o domínio que acomoda o hemo *d<sub>1</sub>* (aa. 267-271 e 324-345). Já na situação do cit. *c<sub>552</sub>*, observa-se que os aminoácidos que estabelecem interação encontram-se dispersos por quase toda a sequência polipeptídica do parceiro redox.

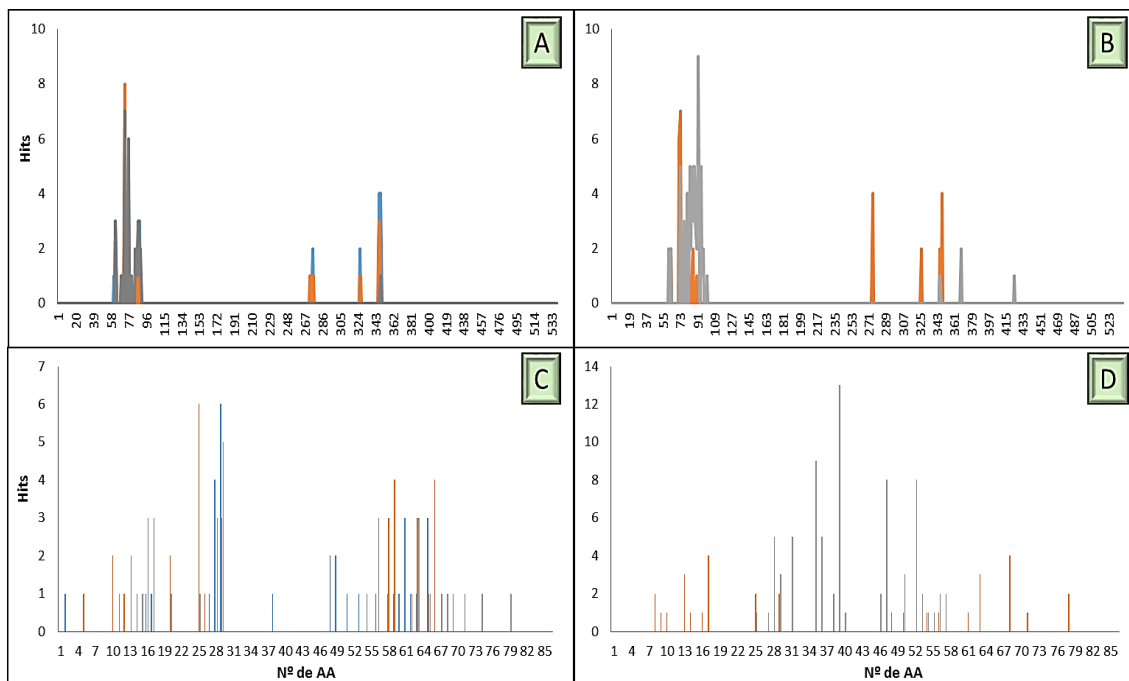


Figura 3.36- Distribuição, na cadeia polipeptídica da cit. *cd<sub>1</sub> NiR* de e do cit. *c<sub>552</sub>* ambos provenientes de *M. hydrocarbonoclasticus*, dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. *c<sub>552</sub>* e a proteína, respectivamente. Resultados dos vários *dockings* do parceiro redox nas suas duas formas estruturais (mono-dimérica): A e C- monómero e B e D- dímero. Sendo a cadeia polipeptídica da cit. *cd<sub>1</sub> NiR* representada em A e B e a cadeia polipeptídica do cit. *c<sub>552</sub>* representada em C e D. Diferenciado o tipo de interação por cores: Geométrica- azul, Global score- laranja e Hidrofóbico- cinza.

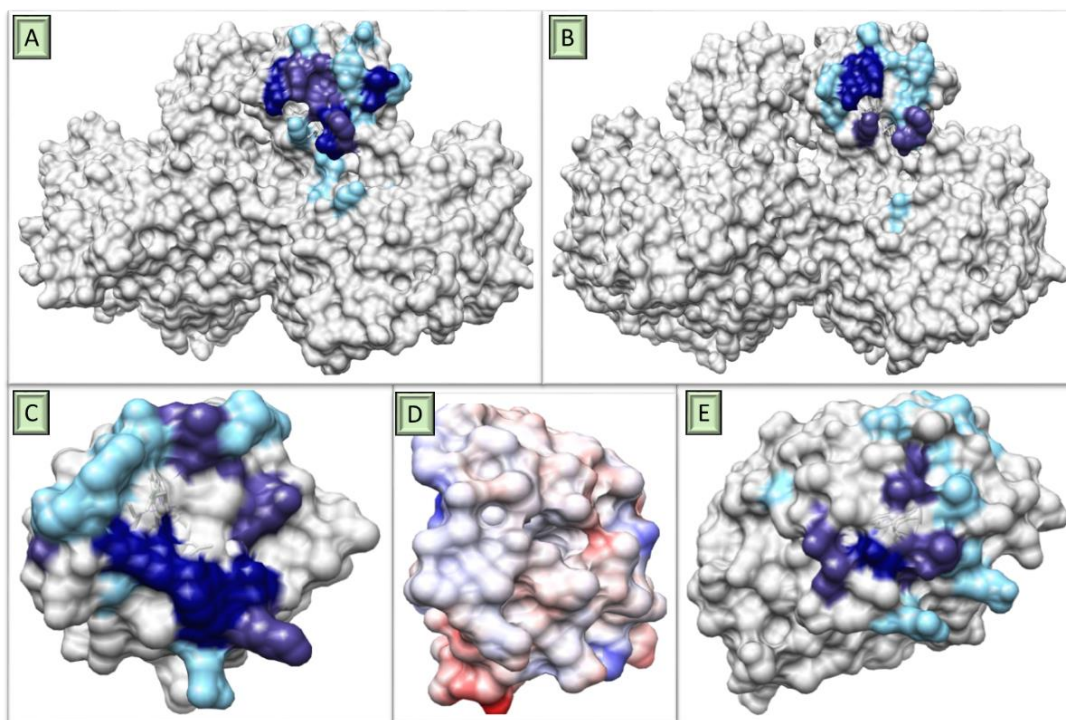


Figura 3.37- Representação do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com o mediador redox/ proteína. O tipo de interações estabelecido é hidrofóbico. Apresentam-se dois estudos de interação entre a proteína e o parceiro redox, este último nas formas monomérica e dimérica. A – coloração dos aa do cit. *cd<sub>1</sub> NiR* que interagem com cit. *c<sub>552</sub>* monomérico; B - coloração dos aa do cit. *cd<sub>1</sub> NiR* que interagem com cit. *c<sub>552</sub>* dimérico; C - coloração dos aa do cit. *c<sub>552</sub>* monomérico que interagem com a enzima; D – mapeamento de superfície do cit. *c<sub>552</sub>* monomérico, com a respectiva distribuição de cargas (constante dielétrica de 4,0). Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas; E - coloração dos aa do cit. *c<sub>552</sub>* dimérico que interagem com a enzima. Estruturas realizadas com recurso ao programa *Chimera 1.6.1*.

Para melhor se verificar a distribuição desses aminoácidos na estrutura tridimensional, apresentam-se, na Figura 3.37, as estruturas das duas proteínas, o cit.  $cd_1$  e o cit.  $c_{552}$  (monomérico e dimérico).

Avaliando mais em pormenor os resultados obtidos, verifica-se que para ambas as formas do cit.  $c_{552}$  (monómero e dímero), os aminoácidos que interagem localizam-se em torno do hemo *c*, ou seja, ambas as estruturas possibilitam que a transferência electrónica intermolecular ocorra com este cofactor. Observa-se também que o número de aminoácidos do cit.  $cd_1$  que interactivam com o parceiro redox é maior quando o cit.  $c_{552}$  é monomérico, verificando-se o mesmo quanto ao número de aminoácidos do parceiro redox que interactivam com o cit.  $cd_1$ . Possivelmente, a interacção será mais forte para o par enzima/parceiro redox quando este último está na forma monomérica. Quando comparados estes resultados com as médias das distâncias Fe-Fe, verifica-se que a diferença (entre monómero e dímero) não é significativa (0,4 Å), portanto esta diferença quanto ao número de aminoácidos que interactivam pode tratar-se de um simples artefacto.

Comparando as duas formas estruturais do parceiro redox, conclui-se que as regiões que interagem com a enzima não são as mesmas, uma vez que a superfície do cit.  $c_{552}$  monomérico, a superfície que interage com a enzima coincide com a mesma que serve de interface entre as duas subunidades do dímero. Apesar desta diferença, tal facto não é impeditivo para que exista uma transferência electrónica eficiente, uma vez que o hemo *c* é acessível em várias orientações.

Passando à análise da distribuição de cargas do cit.  $c_{552}$ , observa-se que esta é globalmente homogénea, sendo predominantemente composto por aminoácidos de carga neutra, uma vez que apenas possui, por monómero, 5 resíduos ácidos ( $pI = 6,8$  [13, 30]). Quando ocorre a interacção com o cit.  $cd_1$  NiR não existem repulsões electrostáticas mas apenas ligeiras alterações na orientação de interacção entre moléculas, uma vez que a enzima possui maioritariamente cargas positivas em torno do hemo *c* (Figura 3.26-A e B da secção 3.5.1).

Conclui-se assim que não existe uma preferência pela estrutura monomérica ou dimérica do parceiro redox e, uma vez que ambas se encontram em equilíbrio em solução, a forma estrutural não é uma limitação para que a transferência de electrões ocorra eficientemente.

Pode afirmar-se que, apesar do cit.  $c_{552}$  se tratar do parceiro redox fisiológico e portanto possuir uma possível especificidade para a activação da enzima cit.  $cd_1$ , com os resultados apresentados nesta secção, não é possível afirmar a transferência electrónica intermolecular ocorra eficientemente entre estas proteínas. Sabe-se que a estrutura do cit.  $cd_1$  foi simulada a

partir de uma estrutura (*Ps. aeruginosa*) determinada a pH 8,4 [42]; que a actividade do cit. *cd<sub>1</sub>*, de *M. hydrocarbonoclasticus*, possui o seu máximo a pH 6,3 [2] e que a partir de pH 7 toma valores muito baixos de actividade; e que o estudo de simulação realizado, pelo algoritmo *BIGGER*, assume, na sua modelação o pH 7. Conjugando estes factores e tendo em conta os resultados obtidos nesta secção (distância Fe-Fe superior a 14 Å), comparando-os com os resultados obtidos experimentalmente por electroquímica, conclui-se que existe uma dependência do pH na relação de interacção entre o par cit. *cd<sub>1</sub>*/cit. *c<sub>552</sub>*, sendo assim, é afectada a transferência electrónica intermolecular e por conseguinte a actividade de catálise da enzima. Desta forma deve questionar-se quanto à existência de funcionalidade do par proteico nestas condições.

Como forma de evitar a dependência com o pH e avaliar as interacções estabelecidas entre o par enzima/parceiro redox, esta análise deverá ser feita com uma estrutura determinada a um valor de pH que a enzima possua uma elevada constante de transferência electrónica intermolecular (entre pH 5,5 e 6,5) [2], de modo a garantir que os soluções de docking apresentadas reflitam um complexo funcional enzimaticamente e que permitam reproduzir os resultados experimentais.

#### b) Citocromo c de coração de cavalo

O citocromo c de coração de cavalo foi o parceiro redox (biológico, não fisiológico) escolhido para se estudar as interacções com o cit. *cd<sub>1</sub>* NiR. Primeiramente avaliou-se o tipo de interacção que permita que a troca de electrões entre enzima/parceiro (hemo c da enzima).

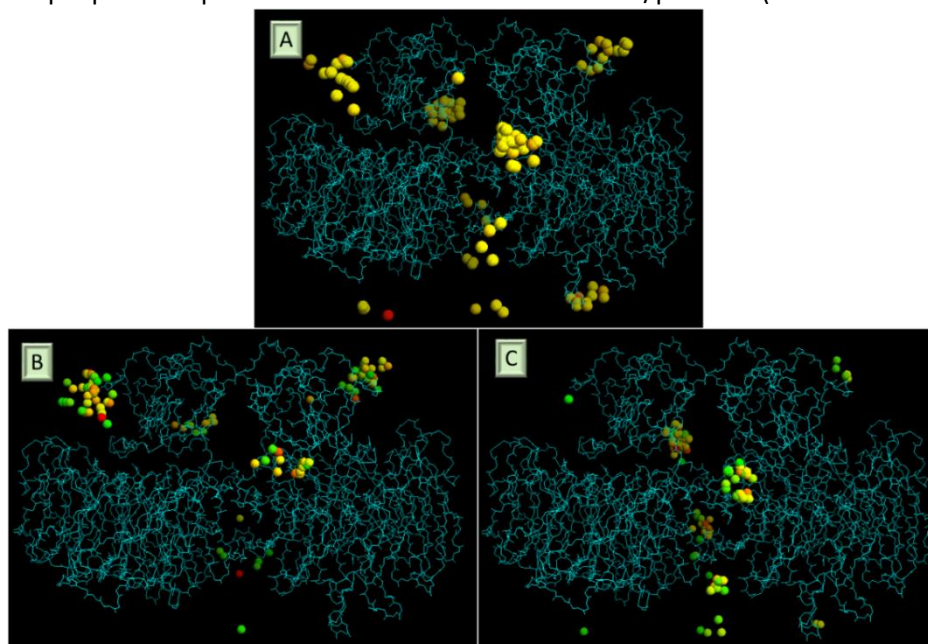


Figura 3.38- Representação do ranking das 100 interacções mais favoráveis entre cit. *cd<sub>1</sub>* NiR e o cit. c de coração de cavalo; apresentando-se os três tipos de parâmetros de interacção: A – representação do *global score*; B – representação das interacções hidrofóbicas; C – representação das interacções geométricas. As esferas indicam o centro geométrico do parceiro redox, com a graduação de cores verde (menos favorável) a vermelho (mais favorável) energeticamente.

Verifica-se que, também para este parceiro redox, o tipo de interacção hidrofóbica é que melhor permite a transferência de electrões intermolecular ocorra com o hemo *c* da enzima. Como se pode observar na Figura 3.38, quando as interacções são do tipo geométrico ou *global score*, as soluções apresentadas indicam que o cit. *c* interage preferencialmente na base da proteína ou entre as duas subunidades, o que não permite que a transferência electrónica intermolecular ocorra com o hemo *c* da enzima.

*Tabela 3.10-* Valores médios das distâncias do “top 12” e do “top 5” entre átomo de Fe do hemo *c* do parceiro redox, cit. *c* de coração de cavalo e o Fe do hemo do tipo *c* da proteína cit. *cd*<sub>1</sub> NiR de *M. hydrocarbonoclasticus*, diferenciando-se várias categorias de interacção.

<b><i>M.</i> <i>hydrocarbonoclasticus</i></b>	<b>Coração de cavalo</b>	<b>Categoria de interacção</b>	<b>Distância Fe-Fe (Å)</b>	
			<b>Média “top 12”</b>	<b>Média “top 5”</b>
<b>Citocromo <i>cd</i><sub>1</sub> NiR</b>	<u>Citocromo <i>c</i></u>	Global score	16.869	14.806
		Hidrofóbica	16.671	14.892
		Geométrica	17.963	16.088

Seguidamente, apresentam-se os resultados médios das distâncias Fe-Fe, na Tabela 3.10. Verifica-se, novamente, que o tipo hidrofóbico é o que permite uma transferência electrónica intermolecular mais próxima entre os átomos de ferro; e quando comparados estes resultados com os apresentados na Tabela 3.9 para a relação entre cit. *cd*<sub>1</sub>/cit. *c*<sub>552</sub>, as distâncias médias apresentadas são muito idênticas ( $\approx 15$  Å).

Verificaram-se os tipos de interacções estabelecidas entre as duas proteínas, observando-se os aminoácidos que contribuem para as interacções e quais as suas posições relativas nas estruturas primárias.

Pela observação da Figura 3.39-A, verificou-se que esses aminoácidos se localizam preferencialmente junto ao domínio que acomoda o hemo *c* da enzima (aa. 56-91), existindo uma segunda região de interacção (em menor número), constituída por aminoácidos do domínio catalítico. Quanto à Figura 3.39-B, verifica-se que existem aminoácidos que estabelecem interacções, ao longo de toda a estrutura primária do cit. *c*, não se observando regiões preferenciais de interacção.



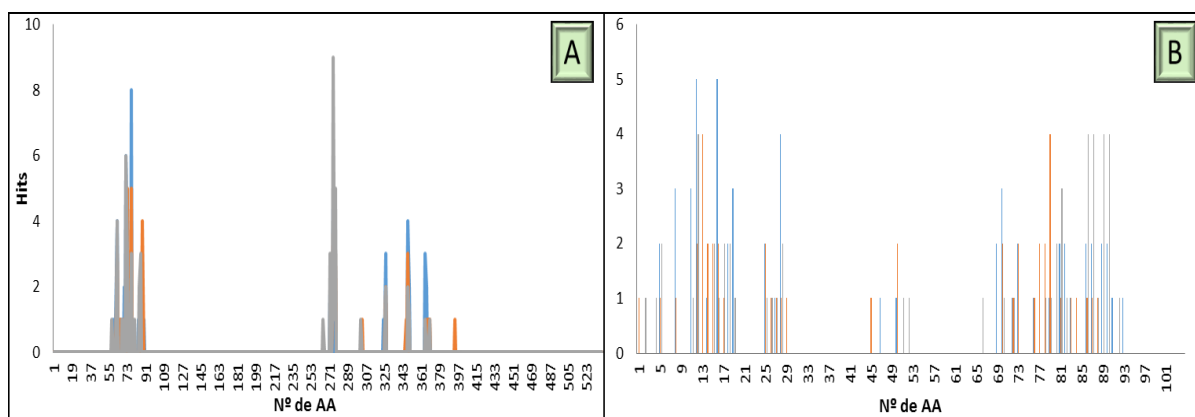


Figura 3.39- Distribuição, na cadeia polipeptídica da cit. *cd<sub>1</sub> NiR* de *M. hydrocarbonoclasticus* e do cit. *c* de coração de cavalo, dos aminoácidos que estabelecem ligações de hidrogénio com o parceiro redox cit. *c* e a proteína, respectivamente. A – cadeia polipeptídica da enzima cit. *cd<sub>1</sub> NiR*; e B – cadeia polipeptídica do parceiro redox, cit. *c*. Diferenciado o tipo de interacção por cores: Geométrica- azul, Global score- laranja e Hidrofóbico- cinza.

Para melhor se verificar quais as posições relativas, na estrutura tridimensional, dos aminoácidos que estabelecem as interacções entre a enzima e o parceiro redox, apresenta-se a Figura 3.40.

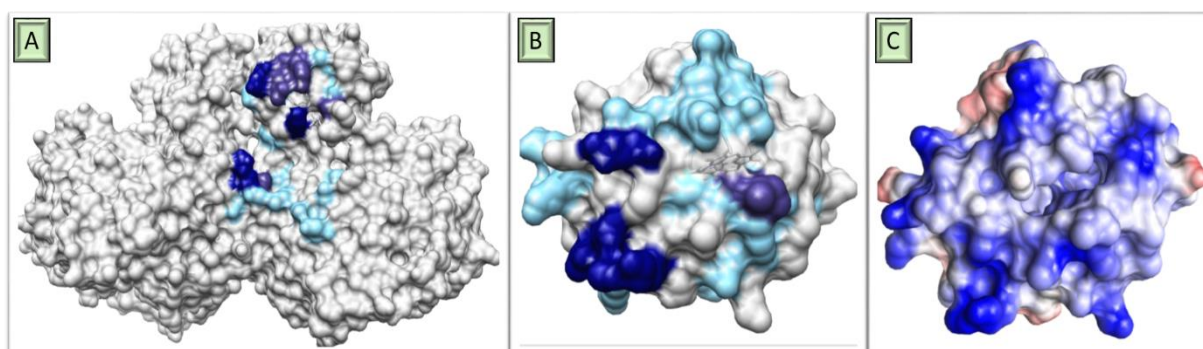


Figura 3.40- Representações do mapa de superfície com evidência das regiões que estabelecem pontes de hidrogénio, interagindo com o parceiro redox/proteína, o tipo de interacções estabelecidas são hidrofóbicas. A – coloração dos aa do cit. *cd<sub>1</sub> NiR* que interagem com cit. *c* de coração de cavalo; B - coloração dos aa do cit. *c* que interagem com a enzima; C – Mapeamento de superfície do cit. *c*, com a respectiva distribuição de cargas (constante dielétrica de 4). Vermelho- cargas negativas, branco- cargas neutras e azul- cargas positivas. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.

Analisando assim as estruturas tridimensionais das duas proteínas, verifica-se que os aminoácidos do cit. *cd<sub>1</sub>* que mais directamente estabelecem interacção com o parceiro redox, encontram-se localizados em redor do hemo *c*, existindo, também, alguns aminoácidos (em menor número) pertencentes ao domínio catalítico. Na Figura 3.40-B, verifica-se uma dispersão dos aminoácidos do cit. *c* que interagem com a enzima, localizando-se estes na superfície da proteína, não estando concentrados apenas junto ao grupo hémico. Este facto pode dever-se ao

tamanho mais reduzido do parceiro e à posição relativa do hemo *c*, tornando-se acessível de diversos pontos da estrutura tridimensional.

Por fim, avaliando a distribuição de cargas do cit. *c* e comparando com as regiões de interacção estabelecidas com a enzima, verifica-se que os aminoácidos localizados em torno do hemo *c* possuem carga neutra, o que evita a existência de repulsões electrostática e os aminoácidos adjacentes a estes, tal como a globalidade da proteína, se encontram carregados positivamente ( $pI=10$  [30]). Assim sendo, as interacções estabelecidas com a enzima não encontraram repulsão de cargas, uma vez que esta se encontra carregada negativamente,  $pI=5,05$  [30] (ver Figura 3.26-A e B da secção 3.5.1).

Concluindo, apesar do cit. *c* de coração de cavalo não ser um parceiro redox fisiológico da proteína cit. *cd<sub>1</sub>*, pelos resultados apresentados nesta secção, poder-se-ia afirmar que o cit. *c* de coração de cavalo transfere electrões para o hemo *c* da enzima cit. *cd<sub>1</sub>*. Esta conclusão contradiz o verificado nos resultados de experimentais, uma vez que por voltametria cíclica não se verificou resposta catalítica significativa da enzima. Tendo em conta as deduções e as distâncias média Fe-Fe, conclui-se que existe uma dependência do valor do pH que está a influenciar os resultados, tal como explicado para o estudo com o cit. *c<sub>552</sub>*, questionando assim quanto à existência de funcionalidade do complexo.

### 3.5.3.2 *Mediadores químicos*

Para um estudo mais vasto da transferência electrónica intermolecular da enzima, alargou-se o campo de estudo e avaliou-se o comportamento que os compostos químicos têm nessa troca electrónica, ou seja, a capacidade destes compostos transferirem electrões para a enzima permitindo a existência de trocas de electrões para a enzima. Assim escolheram-se 4 composto que possuem potenciais formais de redução distintos, do PMS com um potencial de +80 mV, até ao composto paraquat cujo potencial ronda os -440 mV vs NHE.

a) PMS

O primeiro mediador estudado foi o PMS (+80 mV). O estudo das interações dos mediadores químicos com a enzima cit. *cd<sub>1</sub>* NiR é mais simples que o apresentado para os parceiros redox biológicos. Assim sendo, no primeiro resultado, apresentam-se os 9 locais em que o mediador consegue interagir com o hemo *c* da enzima.

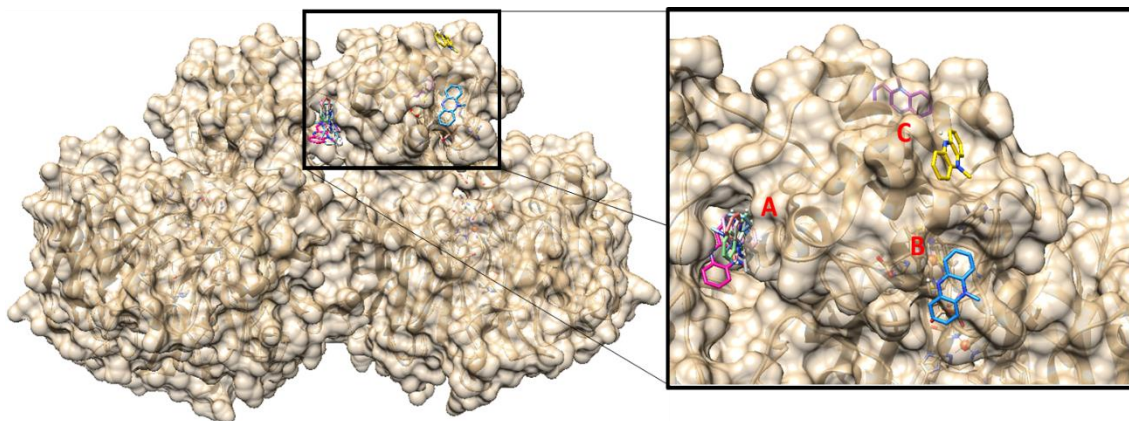


Figura 3.41- Representação das 9 possíveis interações entre o hemo *c* da enzima cit. *cd<sub>1</sub>* e o mediador químico, o PMS; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interação: A- 5 moléculas com 5,3-5,6 kcal/mol, B- 2 moléculas 5,3 kcal/mol e C- 1 molécula 5,2 kcal/mol. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.

Pela observação da Figura 3.41, podem verificar 3 possíveis locais de interação do mediador com a enzima, sendo estes ordenados segundo um ordem de afinidade de ligação, a qual varia de 5,2-5,6 kcal/mol verificando-se que as moléculas que interactivam na posição A possuem afinidade de ligações mais energéticas, e observam-se em maior número.

b) Índigo Carmine

O segundo mediador foi o índigo carmine (+80 mV). Os resultados que se apresentam na Figura 3.42 indicam os dois possíveis locais na estrutura da enzima em que existe uma maior probabilidade deste mediador estabelecer interacção junto ao hemo *c*.

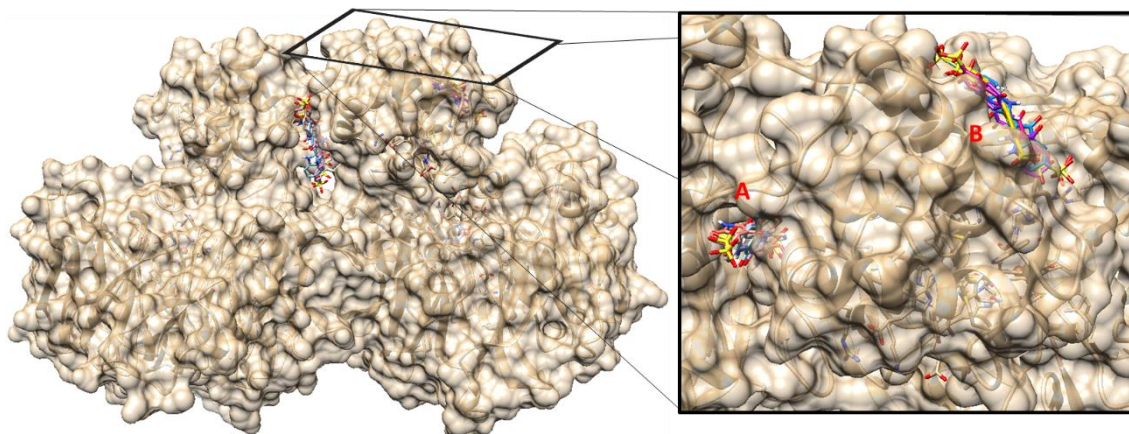


Figura 3.42- Representação das 9 possíveis interações entre o hemo *c* da enzima cit. *cd<sub>1</sub>* e o mediador químico, o índigo carmine; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interação: A- 4 moléculas com 5,5-5,2 kcal/mol e B- 5 moléculas 5,2-5,0 kcal/mol. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.



Os resultados apresentados indicam apenas dois locais para ser estabelecida a interacção com a enzima, pelo mediador, variando as energias da afinidade de ligação de 5,0- 5,5 kcal/mol, sendo as mais energéticas, em maior número, observadas na posição A.

c) Fenosafanina

Seguidamente procedeu-se ao mesmo estudo para a fenosafranina (-125 mV vsNHE). Os resultados para este mediador apresentam-se na Figura 3.43.

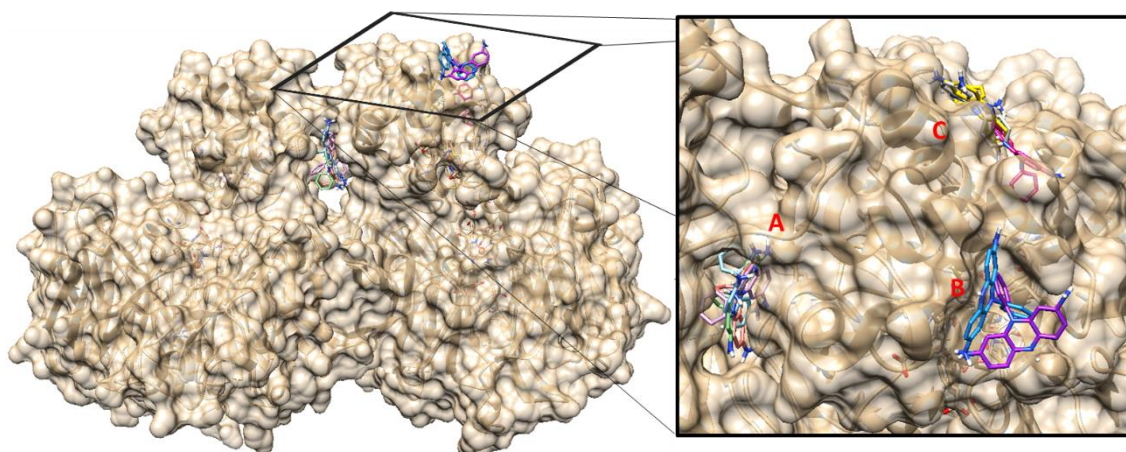


Figura 3.43- Representação das 9 possíveis interacções entre o hemo *c* da enzima cit. *cd*<sub>1</sub> e o mediador químico, a fenosafranina; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interacção: A- 4 moléculas com 5,6-6,8 kcal/mol, B- 2 moléculas 5,4-5,5 kcal/mol e C- 3 moléculas 5,3-5,4 kcal/mol. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.

Pela observação dos resultados verifica-se a existência de 3 locais em que a fenosafranina pode interactuar com o cit. *cd*<sub>1</sub> e transferir electrões para o hemo *c*. A posição que se verifica a existência de mais moléculas e com energia de afinidade da ligação mais elevada, para o conjunto das soluções, é indicado por A; variando esta energia de 5,3-6,8 kcal/mol.

d) Paraquat

Por fim, o último mediador analisado foi o paraquat (-440 mV vs NHE).

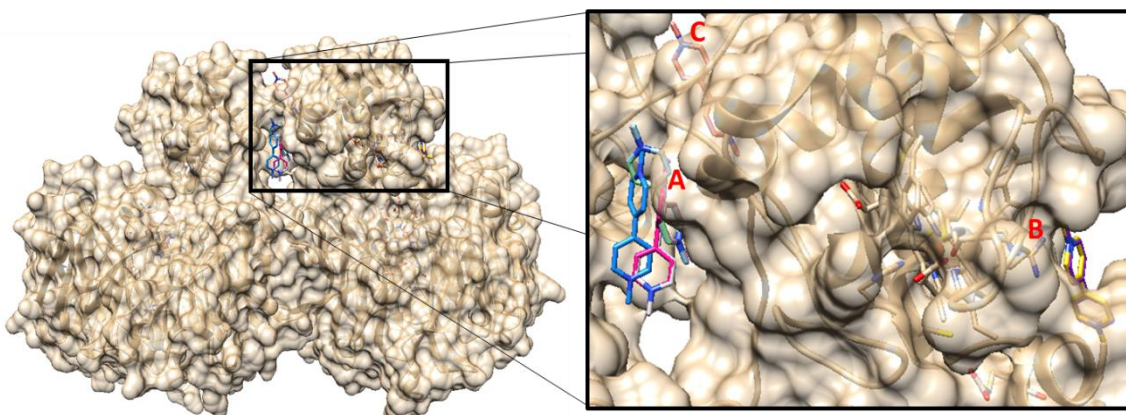


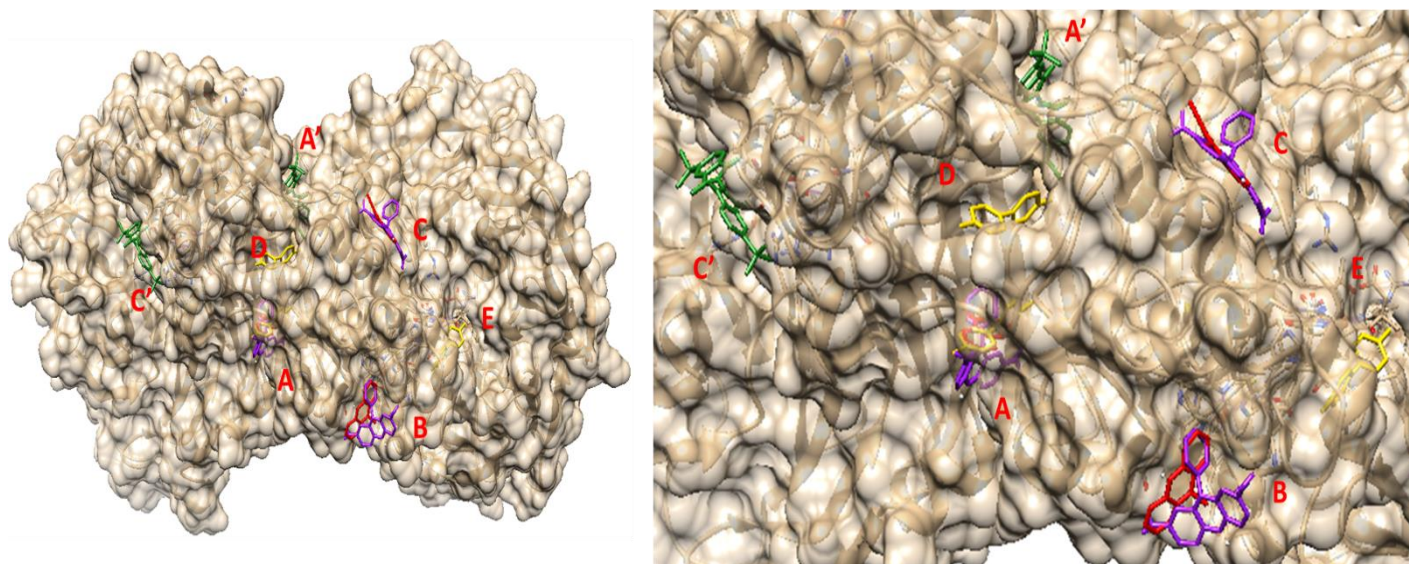
Figura 3.44- Representação das 9 possíveis interacções entre o hemo *c* da enzima cit. *cd*<sub>1</sub> e o mediador químico, o paraquat; inserção dessa região ampliada e definição das 3 locais preferenciais de interacção: A- 5 moléculas, B- 3 moléculas e C- 1 moléculas.

Para este mediador químico, verifica-se que a distribuição dos locais de possível interação ocorreu em 3 posições sendo A preferencial em número de moléculas e em energia da afinidade de ligação.

#### e) Análise dos resultados

O programa utilizado para simular as interações entre os mediadores químicos e a enzima cit. *cd<sub>1</sub> NiR*, apenas avalia este tipo de compostos tendo em conta a sua estrutura e não as suas propriedades químicas (como seja o potencial), pelo que os resultados obtidos mostram-se semelhantes entre os 4 compostos analisado. Verifica-se para cada mediador, a existência de 3 locais possíveis de se estabelecer interações, sendo para todos os compostos a posição A coincidente e preferencial em termos de número de moléculas como pela energia de afinidade de ligação mais elevada.

Para facilitar a análise, esta foi feita numa nova representação, tendo em conta o local de interação em vez do mediador químico isoladamente, pois o utilizado não consegue fazer distinção entre estes. Assim, apresenta-se na Figura 3.45 a distribuição das posições de interação mostrando-se uma molécula de cada mediador em cada uma das posições.



*Figura 3.45- Representação dos mediadores químicos distribuídos pelas posições de interação como cit. *cd<sub>1</sub>* (vista da superfície dos hemis c), sendo diferenciados cada um por uma cor: vermelho – PMS; verde – índigo carmine; roxo – fenosafranina; e amarelo – paraquat. Estando cada um presente nas posições: A/A' – PMS, fenosafranina, paraquat e/ índigo carmine; B – PMS e fenosafranina; C/C' – PMS, fenosafranina e/ índigo carmine; D-E – paraquat. As posições A/A' e as C/C' são equivalentes entre si, no monómero adjacente. Estruturas realizadas com recurso ao programa Chimera 1.6.1.*

Utilizando o software HARLEM, foi possível verificar o percurso dos electrões, entre o mediador e o hemo *c* da enzima, caracterizando-se a transferência electrónica e a indicação dos aminoácidos que a auxiliam, bem como a energia de acoplamento associada. Na Tabela 3.11 apresenta-se o resultado desse estudo para cada mediador químico, em cada uma das posições, nas quais se verificam as suas interacções.

*Tabela 3.11-* Apresentação dos percursos electrónicos percorridos entre o doador e o hemo *c* da enzima, passando pelos vários aminoácidos com indicação das energias de acoplamento; para cada um dos mediadores tendo em conta o local de interacção na estrutura do cit. *cd<sub>1</sub>*.

Local de interacção	Mediador	Percurso electrónico	Energia de acoplamento
<b>A/A'</b>	<b>PMS</b>	→ Pro-118 → Val-222 → Val-55 → Gly-5 → His-53 →	$2,32 \times 10^{-8}$
	<b>Índigo carmine</b>	→ Pro-118 → Val-55 → His-53 →	$3,09 \times 10^{-9}$
	<b>Fenosafranina</b>	→ Met-117 → Val-55 → Lis-58 → His-53 → Gln-57 → Cys-49 →	$2,17 \times 10^{-8}$
	<b>Paraquat</b>	→ Ile-69 → Thr-66 → Leu-65 →	$1,18 \times 10^{-6}$
<b>B</b>	<b>PMS</b>	→ Ala-80 → Phe-81 →	$3,57 \times 10^{-4}$
	<b>Fenosafranina</b>	→ Ala-80 → Phe-81 →	$2,42 \times 10^{-4}$
<b>C/C'</b>	<b>PMS</b>	→ Ile-44 → Gln-43 →	$5,30 \times 10^{-6}$
	<b>Índigo carmine</b>	→ Arg-48 → Cys-49 →	$1,83 \times 10^{-4}$
	<b>Fenosafranina</b>	→ Lis-42 →	$4,49 \times 10^{-5}$
<b>D</b>	<b>Paraquat</b>	→ Pro-280 → His-113 → Lis-58 → Arg-57 → Ile-111 →	$1,21 \times 10^{-7}$
<b>E</b>	<b>Paraquat</b>	→ Trp-83 →	$4,32 \times 10^{-4}$

Com estes resultados, conclui-se que a energia de acoplamento é mais favorável, portanto mais elevada, na posição B para o PMS e fenosafranina, para o índigo é a posição C e a posição E para o paraquat. Para estas mesmas posições, observa-se também que a transferência electrónica é mais propícia de existir visto ocorrer entre dois aminoácidos sequenciais da cadeia.

Por conseguinte, conclui-se que, pela sua energia de acoplamento, a posição A é a que torna menos favorável a transferência de electrões entre o mediador químico e o hemo *c* da enzima, apesar de se ter observado que esta era a posição em que os mediadores químicos se acomodavam mais e em maior número, com energia de afinidade de ligação maior.

### 3.6 CRISTALOGRAFIA

A técnica de cristalografia de raio X constitui uma das técnicas mais importantes para a determinação de estruturas tridimensionais de proteínas ou outras estruturas moleculares, a qual foi utilizada neste trabalho com o intuito de determinar a estrutura tridimensional da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Para tal, em primeiro lugar procedeu-se à tentativa de obtenção de cristais de proteína com qualidade suficiente para difratar a alta resolução, por incidência de radiação de raios X.

#### 3.6.1 Obtenção de cristais de citocromo *cd<sub>1</sub>* NiR

A obtenção de cristais de proteína é um dos passos fundamentais mas também mais limitantes desta técnica. Os cristais são estruturas extremamente organizadas e que apenas são formadas em condições experimentais muito específicas, para a proteína em estudo, demorando algum tempo a formar-se e necessitando que as condições de sejam optimizadas.

Foi utilizada uma amostra de cit. *cd<sub>1</sub>* NiR com um elevado grau de pureza ( $R_p=1,2$ ). Numa primeira etapa, foram determinadas as condições que se manifestassem mais promissoras para a formação de cristais. Assim, após a realização dos *Initial screens*, verificou-se que as melhores condições foram catalogadas como: *Index A5*, *Footprint B2*, *Index D10*, *Index F6* e *Index H6* (ver cristais obtidos, na Figura 3.46 e descrição das condições na Figura 3.47).

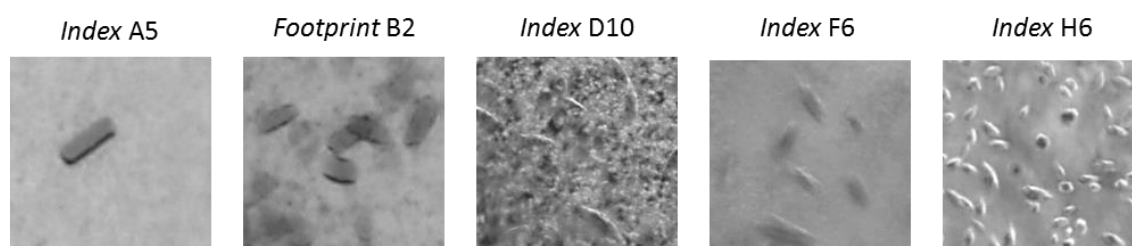


Figura 3.46- Cristais de cit. *cd<sub>1</sub>* de *M. hydrocarbonoclasticus* formados a partir dos *Initial screens*, com 15 mg/ml de proteína.

O tempo de formação destes cristais variou entre 3 (*Index H6*) a 19 dias (*Index A5*, *Footprint B2*), sendo a concentração de proteína utilizada sempre constante, 15 mg/ml (126  $\mu$ M). De seguida procedeu-se à optimização (*fine screens*) destas condições de modo a determinar quais as quantidades e as misturas de agentes precipitantes que poderiam originar os melhores cristais.



De todas os *fines screens* realizados, os que apresentaram melhores resultados, ou seja, cristais aparentemente melhor definidos, apresentam-se na Figura 3.47, juntamente com as respectivas condições de cristalização e o tempo para a sua formação.

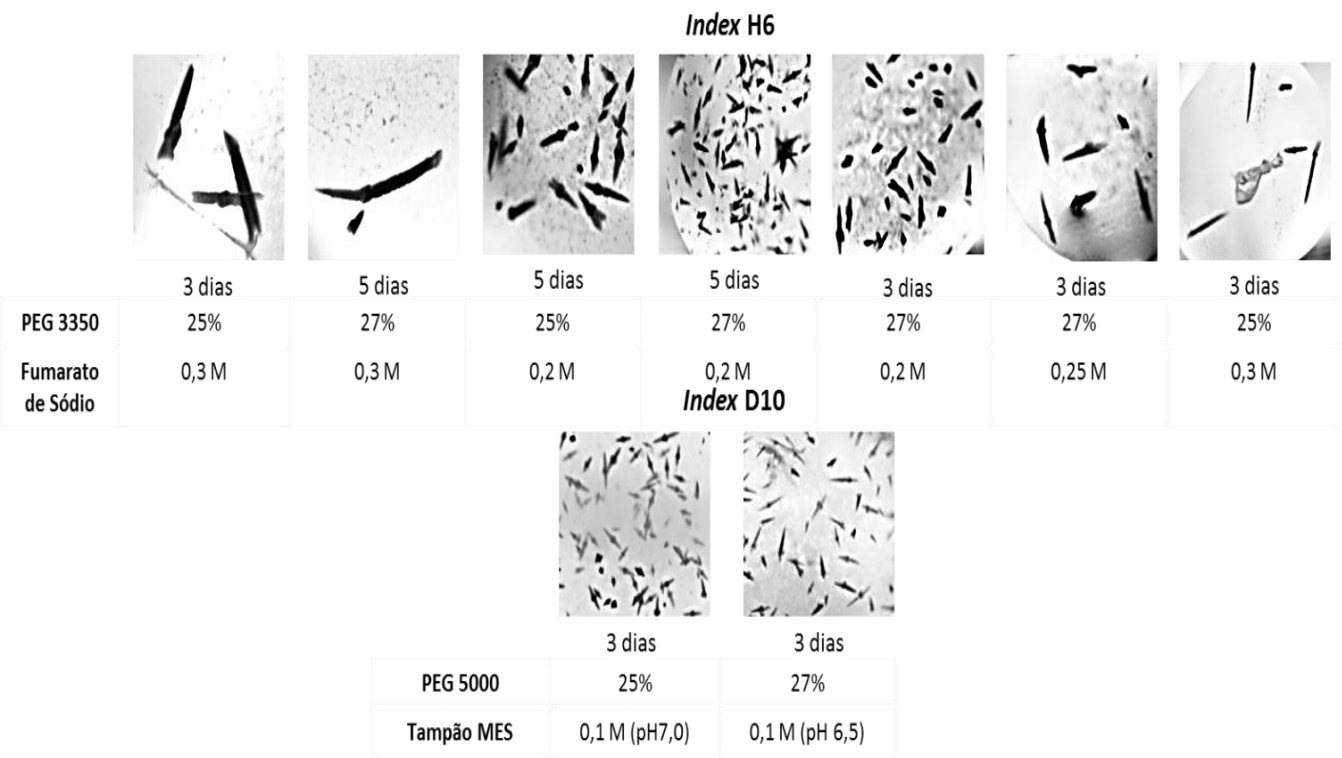


Figura 3.47- Cristais de cit. *cd1* de *M. hydrocarbonoclasticus* formados a partir dos *fines screens* do Index H6 e do Index D10, com temperatura entre 25-28 °C e 15 mg/ml (126 µM) de proteína., fazendo referência às respectivas condições de cristalização.

Seguidamente, e para se avaliar a qualidade dos cristais procedeu-se a um ensaio de difracção de algumas da amostras apresentadas. No entanto, estas não demonstraram muito boa qualidade de difracção, variando a resolução entre 10-15 Å. Até ao momento não foi possível produzir cristais com melhor qualidade, apesar do trabalho na optimização de alguns *fines screens* continuar, em regime de colaboração. Infelizmente não foi possível obter os resultados da difracção de raios X, antes do *términus* desta tese.



## Capítulo 4 CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

---

A realização do trabalho experimental apresentado nesta tese permitiu concluir que a metodologia de purificação utilizada foi eficiente em termos de qualidade final da proteína, tendo-se obtido cit. *cd<sub>1</sub>* activo, na razão de pureza de 1,2 e não se tendo verificado diferenças significativas entre as purificações aeróbia e anaeróbia em ambos os aspectos mencionados.

As constantes de absorvidade molar determinadas experimentalmente apresentam valores inferiores aos referenciados na literatura para a mesma proteína de outros microrganismos. Contudo, uma vez que esta constante depende da composição em aminoácidos, e visto que identidade entre a estrutura primária das proteínas (de *M. hydrocarbonoclasticus* e de *Ps. aeruginosa*) é de 70%, pode-se concluir que esta diferença se deve aos restantes aminoácidos.

No estudo de catálise enzimática na presença de vários parceiros redox (electroquímica mediada) verifica-se que o cit. *C<sub>552</sub>* é o doador electrónico que permite uma velocidade de conversão de substrato mais rápida; quando comparada com o cit. *c*, a velocidade máxima é três vezes maior no caso do cit. *C<sub>552</sub>*. Desta forma, conclui-se existir a necessidade de um doador electrónico com especificidade para cit. *cd<sub>1</sub>* NiR, muito possivelmente para que ocorram as possíveis alterações conformacionais necessárias à activação da enzima (ver secção 1.2.2).

No estudo para a determinação da constante de transferência electrónica intermolecular, verificou-se que o parceiro redox fisiológico (cit. *C<sub>552</sub>*) foi o único doador electrónico que permitiu observar a saturação da actividade enzimática. Apesar da constante de transferência electrónica intermolecular ser ligeiramente inferior ao referido na literatura (cerca de 3 vezes), esta encontra-se na mesma ordem de grandeza. Todos os outros doadores electrónicos estudados apenas permitiram verificar a ocorrência de actividade catalítica para velocidades de varrimento muito baixas. Assumindo que estes mecanismos são do tipo *EC'*, conclui-se que a transferência electrónica heterogénea se torna demasiado rápida, não permitindo que a transferência electrónica entre o par cit. *cd<sub>1</sub>*/doador de electrões ocorra. Como forma de contornar esta limitação, devem repetir-se os ensaios fazendo-se variar a velocidade de varrimento em pequenos intervalos, para velocidades mais baixas. Contudo, como apenas se verificou actividade catalítica nos VCs a 5 e 10 mV/s, esse novo estudo está muito limitado quanto ao volume de dados possíveis de obter.

Apesar de não ter sido determinada a estrutura cristalina da proteína cit. *cd<sub>1</sub>* NiR por cristalografia de raios-X, verificou-se, por modelação computacional, que esta possui uma

elevada homologia e identidade com a proteína de *Ps. aeruginosa*, possibilitando a sua modelação tridimensional, a partir desta última.

No estudo das interacções estabelecidas entre o cit.  $cd_1$  NiR e os parceiros redox, verificou-se não existir uma diferença significativa entre a estrutura monomérica e dimérica do cit.  $c_{552}$ , uma vez que o tipo de interacção e as distâncias entre os átomos de ferro dos hemo do tipo *c* das duas proteínas são muito semelhantes, apesar de se verificar uma diferença na superfície de interacção do cit.  $c_{552}$ . Observa-se que a região da estrutura monomérica do parceiro, que interage com o cit.  $cd_1$ , é a mesma, que na formação do dímero de cit.  $c_{552}$  interage com a segunda subunidade. Contudo, e dados os resultados quanto às distâncias Fe-Fe, não é possível concluir que esta diferença de superfícies de interacção torne inviável a actividade do complexo (cit.  $cd_1$ /cit.  $c_{552}$ ).

Através deste mesmo estudo, não se verificaram diferenças significativas das interacções estabelecidas entre os pares cit.  $cd_1$ /cit.  $c_{552}$  e cit.  $cd_1$ /cit. *c*. Contudo, conclui-se que esses resultados podem ser influenciados pelo valor do pH a que são realizadas as modelações computacionais (pH 7) e a partir do qual a estrutura do cit.  $cd_1$  foi simulada (pH 8,4). Estes valores de pH mostram-se distantes do valor ao qual os ensaios electroquímicos foram efectuados (pH 6,3) e às quais a enzima apresenta uma actividade elevada (pH 5,5-6,5). Daí os resultados obtidos não poderem explicar as diferenças encontradas nos ensaios enzimáticos apresentados e discutidos na secção 3.5.3. Para melhorar este estudo, propõe-se a repetição do mesmo mas com estruturas determinadas a valores de pH próximos dos quais o cit.  $cd_1$  se apresenta activo, para que assim as modelações obtidas permitam compreender melhor o fenómeno de activação da enzima desencadeado pelo docking com o parceiro redox, possivelmente.

Pela análise dos dockings realizados com os mediadores químicos, não se pode concluir quanto ao mediador que permite uma activação do cit.  $cd_1$  NiR energeticamente mais favorável. Apenas se pode verificar qual será a posição em que interacção do mediador com o cit.  $cd_1$  apresenta energia de acoplamento mais propícia e consequentemente a uma troca electrónica com hemo *c* da enzima. Conclui-se que as soluções que se localizam junto ao domínio que acomoda o hemo *c* são as que possuem energia de acoplamento mais favoráveis à transferência electrónica.

## Capítulo 5 BIBLIOGRAFIA

---

- [1] B. C. Berks, S. J. Ferguson, J. W. Moir, and D. J. Richardson, "Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1232, no. 3, pp. 97–173, Dec. 1995.
- [2] H. Lopes, S. Besson, I. Moura, and J. J. G. Moura, "Kinetics of inter- and intramolecular electron transfer of *Pseudomonas nautica* cytochrome cd 1 nitrite reductase: regulation of the NO-bound end product," *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 55–62, Jan. 2001.
- [3] D. E. Canfield, A. N. Glazer, and P. G. Falkowski, "The evolution and future of Earth's nitrogen cycle.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 330, no. 6001, pp. 192–6, Oct. 2010.
- [4] P. J. González, C. Correia, I. Moura, C. D. Brondino, and J. J. G. Moura, "Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction.," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 100, no. 5–6, pp. 1015–23, May 2006.
- [5] Y. Henry and P. Bessieres, "Denitrification and nitrite reduction *Pseudomonas aeruginosa* nitrite-reductase," *Biochimie*, vol. 66, pp. 259–289, 1984.
- [6] J. Cabral, M. Aires-Barros, and G. M., "Engenharia Enzimática," *Lidel*, pp. 5–8, 121–139, 2003.
- [7] K. Brown, D. Nurizzo, S. Besson, W. Shepard, J. Moura, I. Moura, M. Tegoni, and C. Cambillau, "MAD structure of *Pseudomonas nautica* dimeric cytochrome c552 mimicks the c4 Dihemic cytochrome domain association.," *Journal of molecular biology*, vol. 289, no. 4, pp. 1017–28, Jun. 1999.
- [8] M. Giles, N. Morley, E. M. Baggs, and T. J. Daniell, "Soil nitrate reducing processes - drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production.," *Frontiers in microbiology*, vol. 3, no. December, p. 407, Jan. 2012.
- [9] J. N. Galloway, "The global nitrogen cycle: changes and consequences," *Environmental Pollution*, vol. 102, no. 1, pp. 15–24, Jan. 1998.
- [10] N. Skovgaard, "Microbiological aspects and technological need: technological needs for nitrates and nitrites.," *Food additives and contaminants*, vol. 9, no. 5, pp. 391–7, 2009.
- [11] N. G. Hord, Y. Tang, and N. S. Bryan, "Food sources of nitrates and nitrites : the physiologic context for potential health benefits 1 – 3," no. 6, pp. 1–10, 2009.
- [12] M. G. Almeida, A. Serra, C. M. Silveira, and J. J. G. Moura, "Nitrite biosensing via selective enzymes--a long but promising route.," *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 10, no. 12, pp. 11530–55, Jan. 2010.
- [13] I. Moura and J. J. G. Moura, "Structural aspects of denitrifying enzymes," *Chemical Biology*, vol. 5, pp. 168–175, 2001.

- [14] C. Moreno, C. Costa, I. Moura, J. L. E. Gall, M. Y. Liu, W. J. Payne, and C. Van Duk, "Electrochemical studies of the hexaheme nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774," vol. 86, pp. 79–86, 1993.
- [15] D. Nurizzo, M. C. Silvestrini, M. Mathieu, F. Cutruzzolà, D. Bourgeois, V. Fülöp, J. Hajdu, M. Brunori, M. Tegoni, and C. Cambillau, "N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*," *Structure (London, England : 1993)*, vol. 5, no. 9, pp. 1157–71, Sep. 1997.
- [16] S. Rinaldo, A. Arcovito, M. Brunori, and F. Cutruzzolà, "Fast dissociation of nitric oxide from ferrous *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase. A novel outlook on the catalytic mechanism," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 20, pp. 14761–7, May 2007.
- [17] J. H. van Wonderen, C. Knight, V. S. Oganessian, S. J. George, W. G. Zumft, and M. R. Cheesman, "Activation of the cytochrome cd1 nitrite reductase from *Paracoccus pantotrophus*. Reaction of oxidized enzyme with substrate drives a ligand switch at heme c," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 38, pp. 28207–15, Sep. 2007.
- [18] E. Lojou, F. Cutruzzolà, M. Tegoni, and P. Bianco, "Electrochemical study of the intermolecular electron transfer to *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome cd1 nitrite reductase," *Electrochimica Acta*, vol. 48, no. 8, pp. 1055–1064, Apr. 2003.
- [19] D. J. Richardson, "Inorganic nitrogen metabolism in bacteria," *Chemical Biology*, vol. 3, pp. 207–219, 1999.
- [20] D. Nurizzo, F. Cutruzzolà, M. Arese, D. Bourgeois, M. Brunori, C. Cambillau, and M. Tegoni, "Conformational changes occurring upon reduction and NO binding in nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*," *Biochemistry*, vol. 37, no. 40, pp. 13987–96, Oct. 1998.
- [21] M. C. Márquez and A. Ventosa, "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms," *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 55, no. Pt 3, pp. 1349–51, May 2005.
- [22] C. Sproer, E. Lang, P. Hobeck, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and B. J. Tindall, "Transfer of *Pseudomonas nautica* to *marinobacter hydrocarbonoclasticus*," *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 48, pp. 1445–1448, 1998.
- [23] F. Cutruzzolà, S. Rinaldo, N. Castiglione, G. Giardina, I. Pecht, and M. Brunori, "Nitrite reduction: a ubiquitous function from a pre-aerobic past," *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 31, no. 8, pp. 885–91, Aug. 2009.
- [24] A. S. Serra, S. R. Jorge, C. M. Silveira, J. J. G. Moura, E. Jubete, E. Ochoteco, G. Cabañero, H. Grande, and M. G. Almeida, "Cooperative use of cytochrome cd1 nitrite reductase and its redox partner cytochrome c552 to improve the selectivity of nitrite biosensing," *Analytica chimica acta*, vol. 693, no. 1–2, pp. 41–6, May 2011.

- [25] M. Arese, W. G. Zumft, and F. Cutruzzolà, "Expression of a fully functional cd1 nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas stutzeri*," *Protein expression and purification*, vol. 27, no. 1, pp. 42–8, Jan. 2003.
- [26] M. C. Silvestrini, F. Cutruzzolà, M. E. Schininà, B. Maras, G. Rolli, and M. Brunori, "Isolation and characterization of the d1 domain of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 62, no. 2, pp. 77–87, May 1996.
- [27] K. Kobayashi, a Koppenhöfer, S. J. Ferguson, N. J. Watmough, and S. Tagawa, "Intramolecular electron transfer from c heme to d1 heme in bacterial cytochrome cd1 nitrite reductase occurs over the same distances at very different rates depending on the source of the enzyme," *Biochemistry*, vol. 40, no. 29, pp. 8542–7, Jul. 2001.
- [28] S. Besson, C. Carneiro, J. J. G. Moura, I. Moura, and G. Fauque, "A Cytochrome cd1-type Nitrite Reductase Isolated from the Marine Denitrifier *Pseudomonas nautica* 617: Purification and Characterization." *Anaerobe*, pp. 219–226, 1995.
- [29] Y. Matsuura, T. Takano, and R. E. Dickerson, "Structure of cytochrome c551 from *Pseudomonas aeruginosa* refined at 1.6 Å resolution and comparison of the two redox forms," *Journal of molecular biology*, vol. 156, no. 2, pp. 389–409, Apr. 1982.
- [30] C. M. Silveira and M. G. Almeida, "Small electron-transfer proteins as mediators in enzymatic electrochemical biosensors," *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp. 3619–3635, Feb. 2013.
- [31] L. M. Saraiva, G. Fauque, S. Besson, and I. Moura, "Physico-chemical and Spectroscopic Properties of the Monohemic Cytochrome C552 from *Pseudomonas nautica* 617," *European Journal of Biochemistry*, vol. 224, no. 3, pp. 1011–1017, Sep. 1994.
- [32] S. R. Pauleta, S. Dell'Acqua, and I. Moura, "Nitrous oxide reductase," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 257, no. 2, pp. 332–349, Jan. 2013.
- [33] U. N. De Lisboa and I. Moura, "Physico-chemical and spectroscopic properties of the monohemic cytochrome," vol. 1017, pp. 1011–1017, 1994.
- [34] S. Dell'Acqua, S. R. Pauleta, P. M. Paes de Sousa, E. Monzani, L. Casella, J. J. G. Moura, and I. Moura, "A new CuZ active form in the catalytic reduction of N(2)O by nitrous oxide reductase from *Pseudomonas nautica*," *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 15, no. 6, pp. 967–76, Aug. 2010.
- [35] M. L. Rodrigues, T. F. Oliveira, I. a C. Pereira, and M. Archer, "X-ray structure of the membrane-bound cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination," *The EMBO journal*, vol. 25, no. 24, pp. 5951–60, Dec. 2006.
- [36] C. F. Goodhew, K. R. Brown, and G. W. Pettigrew, "Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 852, no. 2–3, pp. 288–294, Dec. 1986.
- [37] P. R. Alefounder and S. J. Ferguson, "dissimilatory nitrate reductase by oxygen in *Paracoccus denitrificans*," vol. 192, pp. 231–240, 1980.

- [38] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray, "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 4, no. 11, pp. 2411–23, Nov. 1995.
- [39] M. R. Cheesman, S. J. Ferguson, J. W. Moir, D. J. Richardson, W. G. Zumft, and a J. Thomson, "Two enzymes with a common function but different heme ligands in the forms as isolated. Optical and magnetic properties of the heme groups in the oxidized forms of nitrite reductase, cytochrome cd1, from *Pseudomonas stutzeri* and *Thiosphaera pantotropha*.," *Biochemistry*, vol. 36, no. 51, pp. 16267–76, Dec. 1997.
- [40] L. P. Davidge and K. V. L. Daly, "In silico modelling of Arp1 and Arp2 as targets of Photox ADP-ribosylation," vol. 6, no. 1, pp. 58–71, 2012.
- [41] L. Krippahl, P. Barahona, J. J. G. Moura, and D. De Química, "Constrained Protein Docking with Chemera 3.0," vol. 1, no. 1.
- [42] W. Sun, M. Arese, M. Brunori, D. Nurizzo, K. Brown, C. Cambillau, M. Tegoni, and F. Cutruzzolà, "Cyanide binding to cd(1) nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: role of the active-site His369 in ligand stabilization.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 291, no. 1, pp. 1–7, Feb. 2002.
- [43] D. Nurizzo, F. Cutruzzolà, M. Arese, D. Bourgeois, M. Brunori, C. Cambillau, and M. Tegoni, "Does the reduction of c heme trigger the conformational change of crystalline nitrite reductase?," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 21, pp. 14997–5004, May 1999.
- [44] H. B. Gray and J. R. Winkler, "Electron flow through metalloproteins.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1797, no. 9, pp. 1563–72, Sep. 2010.
- [45] S. Dell'acqua, S. R. Pauleta, E. Monzani, A. S. Pereira, L. Casella, J. J. G. Moura, and I. Moura, "Electron transfer complex between nitrous oxide reductase and cytochrome c552 from *Pseudomonas nautica*: kinetic, nuclear magnetic resonance, and docking studies.," *Biochemistry*, vol. 47, no. 41, pp. 10852–62, Oct. 2008.
- [46] C. Page, "Mechanism for electron transfer within and between proteins," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 7, no. 5, pp. 551–556, Oct. 2003.